ACTA MICROBIOLOGICA

ACADEMIAE SCIENTIARUM HUNGARICAE

ADIUVANTIBUS

D. FEHÉR, J. HORVÁTH, G. IVÁNOVICS, S. KOTLÁN, R. MANNINGER, A. PELC, J. SZIRMAI

REDIGIT

A. HAVAS

TOMUS II FASCICULI 1—2

MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA

BUDAPEST, 1954

ACTA MICROBIOLOGICA

A MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA MIKROBIOLÓGIAI KÖZLEMÉNYEI

KIADÓHIVATAL: BUDAPEST, V., ALKOTMÁNY-UTCA 21.

Az Acta Microbiologica orosz, francia, angol és német nyelven közöl értekezéseket a mikrobiológia tárgyköréből.

Az Acta Microbiologica változó terjedelmű füzetekben jelenik meg. Több füzet alkot egy kötetet.

A közlésre szánt kéziratok, géppel írva, a következő címre küldendők:

Acta Microbiologica, Budapest, Keleti Postahivatal, Postafiók 64.

Ugyanerre a címre küldendő minden szerkesztőségi levelezés.

Az Acta Microbiologica előfizetési ára kötetenként belföldre 80, külföldre 110 Ft. Megrendelhető a belföld számára az Akadémiai Kiadónál (Budapest, V., Alkotmány-utca 21. Bankszámla 04-878-111-46), a külföld számára pedig a »Kultúra« Könyv és Hírlap Külkereskedelmi Vállalatnál (Budapest, VI., Sztálin-út 21. Bankszámla: 43-790-057-181) vagy külföldi képviseleteinél és bizományosainál.

»Acta Microbiologica« публикует трактаты из области микробиологии на русском, французском, английском и немецком языках.

»Acta Microbiologica« выходит отдельными выпусками разного объема. Несколько выпусков составляют один том.

Предназначенные для публикации рукописи (в напечатанном на машинке виде) следует направлять по адресу:

Acta Microbiologica,
Budapest, Keleti Postahivatal, Postafiók 64.

По этому же адресу направлять всякую корреспонденцию для редакции.

Подписная цена »Acta Microbiologica« — 110 форинтов за том. Заказы принимает предприятие по внешней торговле книг и газет »Kultúra« (Budapest, VI., Sztálin-út 21. Текущий счет № 43-790-057-181), или его заграничные представительства и уполномоченные.

ACTA MICROBIOLOGICA

ACADEMIAE SCIENTIARUM HUNGARICAE

ADIUVANTIBUS
D. FEHÉR†, J. HORVÁTH, S. KOTLÁN, R. MANNINGER,
A. PELC, J. SZIRMAI

REDIGIT
G. IVÁNOVICS

TOMUS II

MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA
BUDAPEST, 1955

INDEX

Tomus II.

Fasciculi 1—2

Szabó, I.: Beiträge zur Verbreitung der Tuberkulose des Bovintyps in Ungarn — *Сабо, И.:* Данные о распространенности туберкулеза бычьего типа в Венгрии 3

Szabó, I.: Neue Gesichtspunkte bei der Isolierung von Antibiotika erzeugenden Bodenmikroben — *Сабо, И.:* Новые точки зрения при поисках почвенных микробов, образующих антибиотики 9

Horváth, J., Marton, M. und *Oroszlán, I.:* Vegetative Hybridisationsversuche an Streptomyces — *Хорват, Я., Мартон, М.* и *Оросланн, И.:* Вегетативные гибридизационные эксперименты на видах Streptomyces 21

Krámli, A., Pettkó, E. F. und *Kiss, P.:* Wirkung von Schwermetallen auf Atmung und Redoxpotential von *Streptomyces griseus*-Kulturen — *Крамли, А., Петтко, Э. Ф.* и *Киш, П.:* Влияние тяжелых металлов на дыхание и окислительно-восстановительный потенциал культур Streptomyces griseus 39

Balassa, R.: Transformationsmechanismen der Rhizobien — *Балашша, Р.:* Механизм трансформации ризобиумов 51

Vályi—Nagy, T., Csobán, G. and *Zabos, P.:* Effect of Penicillin on the Nucleic Acid Metabolism of *Staphylococcus aureus* — *Вайи-Надь, Т., Чобан, Г.* и *Забош, П.:* Действие пенициллина на обмен веществ нуклеиновой кислоты культур Staphylococcus aureus 79

Oláh, P.: Production of Antitetanus Serum in Cattle — *Олах, П.:* Данные к производству противостолбнячной сыворотки у рогатого скота 91

Takátsy, Gy. and *Fűrész, J.:* The Antigenic Structure of Influenza Virus as Studied by a Simple Immune Serum Absorption Test — *Такачи, Дь.* и *Фюрес, Я.:* Исследование антигенной структуры вируса гриппа простым методом истощения иммунных сывороток 105

Iványics, G., Horváth, S. and *Szőllősy, E.:* The Influenza Virus Adsorbing Capacity of the Vascular Endothelium of Various Mammals — *Иванович, Г., Хорват, И.* и *Сёллёши, Э.:* Способность эндотелия млекопитающих животных к связыванию вируса гриппа 121

Petrilla, A.: Epidemiological Characteristics of the 1953 Influenza Epidemic in Hungary — *Петрилла, А.:* Эпидемиологические особенности эпидемии гриппа 1953 года в Венгрии 131

Krámli, A., Pulay, G. und *Lantos, J.:* Eine Methode zur Sammlung von sterinoxydierenden Mikroorganismen — *Крамли, А., Пулаи, Г.* и *Лантош, Я.:* Простые методы селекции стеринокислительных микроорганизмов 145

Béládi, I. und *Iványics, G.:* Immunisierung von Laboratoriumstieren mit dem Virus der Aujeszkyschen Krankheit nach dessen Inaktivierung mit Ultraviolettstrahlen — *Белади, И.* и *Иванович, Г.:* Иммунизация лабораторных животных вирусом Ауесского, инактивированным ультрафиолетовыми лучами 151

Pintér, M. and *Balázs, V.:* Studies on Coxsackie Virus Infections in Hungary I. Isolation and Identification of Coxsackie Virus Strains — *Пинтер, М.* и *Балаж, В.:* Изучение инфекций, вызываемых вирусом Coxsackie в Венгрии I. Выделение и идентификация штаммов вируса Coxsackie 161

Váczi, L. and *Uri, J.*: Studies on the Enzyme Penicillinase — *Ваци, Л.* и *Ури, Й.*: Исследование пенициллиназы 167

Csillag, A. and *Brandstein, L.*: The Role of a Blastomyces in the Aetiology of Interstitial Plasmocytic Pneumonia of the Premature Infant — *Чиллаг, А.* и *Брандштейн, Л.*: Роль почкующихся грибков в этиологии плазмоцитарной межуточной пневмонии преждевременно рожденных 179

Kemenes, F.: Über einen Fall von Coccidioidomykose bei einem Kaninchen in Ungarn — *Кеменеш, Ф.*: Случай кокцидиоидомикоза кроликов в Венгрии 191

Sinkovics, J. and *Molnár, E.*: Studies on the Infectivity of Influenza Virus Multiplying in the Mouse Lung — *Шинкович, Й.* и *Мольнар, Э.*: Исследование заразительности размножающегося вируса гриппа в легких мышей 195

Fasciculus 3

Vas, K.: Turbidimetric Measurement of Microbial Density — *Ваш, К.*: Измерение плотности взвеси микробных клеток турбидиметрическим методом 203

Vas, K.: Kinetic Studies of the Factors Influencing Microbial Growth — *Ваш, К.*: Изучение кинетики факторов, влияющих на размножение микробных клеток 215

Vas, K. and *Proszt, G.*: Heat Destruction of Bacterial Spores in the Presence of Chemical Agents — *Ваш, К.* и *Прост, Г.*: Гибель спор бактерий под воздействием теплоты в присутствии химикатов 235

Jeney, E. und *Zsolnai, T.*: Experimentelle Angaben zur Chemotherapeutik der Bruzellose I. — *Енеи, Э.* и *Жольнаи, Т.*: Опытные данные по хемотерапии вруцеллеза I. 249

Sinkovics, J.: Untersuchungen über die Wechselwirkung nichtantibiotischer Pilze und Bakterien — *Шинкович, Й.*: Исследование взаимодействия неантибиотических веществ грибков и бактерий 257

Klement, Z.: A New Bacterial Disease of Rice Caused by *Pseudomonas oryzicola* n. sp. — *Клемент, З.*: Новая бактериальная болезнь риса 265

Ivánovics, G. and *Alföldi, L.*: Observations on Lysogenesis in *B. megaterium* and on Megacine, the Antibacterial Principle of this Bacillus Species — *Иванович, Г.* и *Альфёльди, З.*: О лизогенезе штаммов B. megaterium и о мегацине — антибактериальном начале этого вида бацилл 275

Serény, B.: Experimental Shigella Keratoconjunctivitis — *Шерень, Б.*: Экспериментальный кератоконъюнктивит, вызываемый дизентерийными палочками 293

Földes, J.: The Nature of Specific Polysaccharides of Tubercle Bacilli — *Фёльдеш, Й.*: О свойствах специфических полисахаридов туберкулезной палочки 297

Gláz, E. T.: Researches about the Viability and Preservation of the Conidia of *Claviceps purpurea (Fr.) Tul.*, Grown in Submerged Culture — *Глаз, Э. Т.*: Исследования по продолжению жизнеспособности конидий Claviceps Purpurea (Fries) Tulasne, — изолированных путем погруженного культивирования 315

Fasciculus 4

Tarnóczy, T., Joó, I. und *Szilárd, J.*: Detoxikationswirkung von Ultraschallwellen auf das Endotoxin der *Salmonella typhi* — *Тарноци, Т., Иоо, И.* и *Силард, Я.*: Обезвреживающее действие ультразвуков на антиген тифозной палочки 327

Kesztyűs, L., Salánki, J. und *Koller, M.*: Nervensystem und Immunität III. Die Wirkung von Neurotomie auf das Arthus-Sacharow-Phänomen — *Кестьюш, Л., Шаланки, Я.* и *Коллер, М.*: Нервная система и иммунитет III. Влияние невротомии на феномен Артюса - Сахарова 337

Kesztyűs, L., Csernyánszky, H., Koller, M. und *Salánki, J.*: Nervensystem und Immunität IV. Die Wirkung von Neurotomie und Narkose auf das Shwartzman-Phänomen — *Кестьюш, Л., Черньянски, Г., Коллер, М.* и *Шаланки, Я.*: Нервная система и иммутет IV. Влияние невротомии и наркоза на феномен Шварцмана 343

Kesztyűs, L., Szilágyi, T. und *Csernyánszky, H.*: Nervensystem und Immunität V. Die Wirkung von Neurotomie auf die Diphtherietoxin-Empfindlichkeit der Haut — *Кестьюш, Л., Силадьи, Т.* и *Черньянски, Г.*: Нервная система и иммунитет V. Влияние невротомии на чувствительность кожи к дифтерийному токсину 353

Váczi, L., Gál, K. und *Kubinyi, M.*: Über die Eigenschaften der *Chloramphenicol-resistenten E. coli* O : 111, B : 4-Stämme — *Ваци, Л., Гал, К.* и *Кубиньи, М.*: Изменение свойств штаммов E. coli 0 : 111, B : 4 под воздействием хлорамфеникола 359

Wix, G.: Versuche zur Isolierung von Lithocholsäure-abbauendem Mikroorganismus — *Викс, Дь.*: Эксперименты по выделению микроорганизмов, разлагающих литоколовую кислоту 369

Sinkovics, J.: Virus Neutralisation Experiments with Lymphoid Cell- and Lymph Node-Extracts — *Шинкович, Й.*: Эксперименты по нейтрализации вирусов экстрактами лимфатических клеток и узлов 385

Rauss, K. and *Kétyi, I.*: Immunity in Subjects Recovered from Dysentery — *Раушш, К.* и *Кетьи, И.*: Изучение иммунитета людей переболевших дизентерией 401

Koczka, I.: Experimentelle Studien über die gemeinsame Anwendung von antituberkulotischen Mitteln II. Tierexperimente — *Коцка, И.*: Экспериментальные исследования по совместному применению противотуберкулезных препаратов ... 409

Oláh, P.: Experimental Production of Tetanus Antiserum in Sheep — *Олах, П.*: Опыты по производству противостолбнячных сывороток овец 415

Gregács, M.: Serological and Biochemical Typing of *E. coli* Strains Occurring in Various Waters — *Грегач, М.*: Определение серологических и биохимических типов штаммов E. coli, обнаруживаемых в различных водах 423

Balázs, V. and *Pintér, M.*: Studies on Coxsackie Virus Infection in Hungary II. Studies on Neutralising Antibodies against Fourteen Different Types of Coxsackie Virus in Individual and Pooled Human Sera — *Балаж, В.* и *Пинтер, М.*: Изучение заражений вирусом Coxsackie в Венгрии II. Изучение нейтрализующих антител к 14 различным типам вируса Coxsackie в индивидуальных и смешанных человеческих сыворотках 429

Fürész, I., Mihályfi, I., Lányi, B. und *Gál, K.*: Typenbestimmung, Virulenz und Fermentaktivität der Scharlachstreptokokkenstämme in Ungarn — *Фюрес, И., Михайфи, И., Ланьи, Б.* и *Гал, К.*: Определение типов, вирулентности и энзиматической активности штаммов скарлатинозных стрептококков в Венгрии 435

Rauss, K.: Sitzung der enteralen Themenkommission der Ungarischen Akademie der Wissenschaften am 14. Dezember 1954. 445

András Havas

Am 18. August 1954 verschied nach langem, mutig ertragenem Leiden im Alter von 62 Jahren A. Havas, korrespondierendes Mitglied der Ungarischen Akademie der Wissenschaften, Chefredakteur der Acta Microbiologica. Schon als junger Arzt befasste er sich mit der Mikrobiologie und Pathologie der Tuberkulose, und der Kampf gegen die Tuberkulose bildete auch später den grössten Teil seines Lebenswerkes. Indessen war es ihm nicht immer vergönnt, diese Arbeit in einer der Wissenschaft zuträglichen, ungestörten Atmosphäre zu verrichten. Bereits in früher Jugend gelangte er zur Erkenntnis, dass zur Verwirkiichung eines besseren Lebens nicht nur die Vertiefung der wissenschaftlichen Forschung notwendig ist, sondern dass hierzu auch die bestehende Gesellschaftsordnung verändert werden müsse. Diese Überzeugung war es, die A. Havas bewog, an der Arbeit der Ungarischen Räterepublik tätigen Anteil zu nehmen. Deshalb war er später gezwungen, das Land zu verlassen, und erst nach 8 Jahren bitterer Emigration fand er in der Sowjetunion eine neue Heimat, wo er dann seine Arbeit in Ruhe fortsetzen konnte.

Im Jahre 1946, nach der Befreiung Ungarns, konnte er wieder in sein Vaterland zurückkehren. Hier organisierte er zuerst die BCG-Impfung der Einwohnerschaft, später, im Jahre 1949, wurde er leitender Direktor des Staatl. Instituts für Volksgesundheitswesen. Sehr viel leistete er zur Förderung der medizinischen, vor allem der mikrobiologischen Forschungsarbeit. Er war es, der dem unter seiner Leitung stehenden Institut erst den Charakter eines Forschungsinstituts verlieh. Auf seine Initiative hin wurde im Jahre 1951 die sämtliche ungarische Mikrobiologen vereinigende Ungarische Mikrobiologische Gesellschaft (Magyar Mikro-

biológiai Társaság) gegründet und damit die bis dahin völlig zersplitterte ungarische mikrobiologische Forschungsarbeit zusammengefasst. Von der Gründung der Gesellschaft bis zu seinem Tode bekleidete er das Amt des Präsidenten der UMG und verschaffte der Gesellschaft nicht nur innerhalb der Grenzen Ungarns, sondern auch darüber hinaus Achtung und Ansehen.

Er was es, der die Initiative zur Herausgabe der Acta Microbiologica ergriff und dann, als Chefredakteur ihr oberster Organisator blieb.

Die wissenschaftliche Tätigkeit von A. Havas bezog sich hauptsächlich auf die Tuberkulose, doch ist mit seinem Namen auch die Beschreibung einer bis dahin unbekannten Krankheit, der «Hyperlymphocytosis acuta asymptomatica» verknüpft. Die Hauptarbeit seiner letzten Lebensjahre erschien in den Acta Microbiologica. In ihr berichtete er über seine Forschungen, die sich auf die mikrobiologische Anwendung der biologischen Lehren Mitschurins und Lyssenkos beziehen.

Wir werden ihm stets ein ehrendes Andenken bewahren!

Die Redaktion

BEITRÄGE ZUR VERBREITUNG DER TUBERKULOSE DES BOVINTYPS IN UNGARN

Von
I. SZABÓ

Diagnostisches Laboratorium des Landesinstituts für Tuberkulose

(Eingegangen am 4. September 1953)

Die durch den Bovintyp hervorgerufenen Infektionen spielen in der Epidemiologie der Tuberkulose (Tbc), der Lokalisation der Krankheit im Organismus und in der Heilbarkeit eine wesentliche Rolle. Zahlreiche Forscher [1—15] haben sich mit der epidemiologischen Bedeutung derselben befasst und darauf hingewiesen, dass in jenen Gegenden, wo die Tuberkulose des Rinderbestands mehr verbreitet ist, sich die Tbc-Überstandenheit beim Menschen sowie die Mantoux-Positivität gegen die jüngeren Altersgruppen hin verschiebt. Die Infektionen durch den Bovintyp kommen bei den extrapulmonalen Erkrankungen in einem unverhältnismässig höheren Prozentsatz vor als bei den pulmonalen [6, 16, 17, 18]. Auch bei der Heilbarkeit kommt dem Bakterientyp eine Rolle zu [19, 20]. In unserer Heimat haben sich bis jetzt nur wenige mit den human-pathologischen Beziehungen des Bovinproblems befasst. Bei der Forschung nach den Ursachen der Tbc-Morbidität ist festzustellen, dass neben zahlreichen bekannten Faktoren, welche sich auf die Gestaltung der menschlichen Tuberkulose auswirken (Hebung des Lebensstandards, kultureller Fortschritt, Einführung der BCG-Impfungen usw.) die Zahl der Erkrankungen auch durch die Verbreitung der Rindertuberkulose beeinflusst wird. Dies ist eine äusserst wichtige und bedeutende Frage auf dem Gebiet des Kampfes gegen die Tuberkulose, worauf auch bereits in heimischer Beziehung hingewiesen worden ist [21].

Wir begannen 1950 mit unseren Untersuchungen und beendeten diese 1951. Sodann arbeiteten wir die Ergebnisse auf. Mittels ausgesandter Behälter regulierten wir die Menge des Materials derart, dass dieses aus sämtlichen Landesgegenden gleichmässig eintreffen solle. Auf diese Weise sind im Material die verschiedenen Krankheitsformen und ihre Lokalisationen im Organismus ungefähr der Wirklichkeit entsprechend vertreten. 6% sämtlicher Fälle waren extrapulmonale Erkrankungen ; insgesamt arbeiteten wir 2296 positive Fälle auf.

Das eingetroffene Untersuchungsmaterial wurde auf Löwenstein—Jensenschen Nährboden (mit 0,75 % Glyzerin) geimpft. Auf diesem Nährboden ist der Typ bereits mit grosser Wahrscheinlichkeit bestimmbar. Die Erscheinungszeit der Kolonien, ihre Grösse, Farbe, Oberfläche und Konsistenz ergeben das

für den Typ bezeichnende Bild. Mit den auf Grund dieser Untersuchungen als Bovin erachteten Stämmen impften wir Kaninchen und prüften dann die Pathogenität der Stämme. Die Kaninchen erhielten intravenös Bakterien von 0,01 mg Feuchtgewicht. Die verschiedenartigen, als gemischte Typen angesehenen Stämme wurden — nach Ausstreichen auf einer Löwensteinschen Platte in Petrischale und Isolierung — in Subkultur gebracht, während wir die schwer typisierbaren Fälle nach 20minutiger Vorbehandlung mit 4%iger Natronlauge erneut in Subkultur brachten, und zwar auf Glyzerin enthaltenden und auf sog. glyzerinlosen Löwensteinschen (0,25% Glyzerin enthaltenden) sowie auf flüssigen Nährböden. Erst dann nahmen wir die Bestimmung der Pathogenität am Kaninchen vor. Als Bovintyp anerkannten wir jene Stämme, die auf Grund der übereinstimmenden Ergebnisse der morphologischen und der Pathogenitätsuntersuchungen als solche angesehen werden konnten. Bei einem Grossteil der Stämme befolgten wir auch die Methode von *Roth* [22] und *Benda* [23], die auf der Beobachtung beruht, wonach der Bovintyp in dem vom festen Nährboden genommenen Abstrich keine Cord-Zopf-Formation zeigt. Diese Methode konnten wir neben den übrigen Verfahren gut als Ergänzung bei der Bestimmung des Typs verwerten. Wir arbeiteten unsere Ergebnisse nach folgenden Gesichtspunkten auf:

1. Fälle von Bovintyp unter sämtlichen Erkrankungen;
2. Fälle von Bovintyp unter denen an Lungentuberkulose;
3. Fälle von Bovintyp unter den extrapulmonalen Erkrankungen;
4, 5, 6. das Verhältnis der Bovinbefunde nach Geschlecht, Beschäftigung und Wohnort und
7. das Verhältnis der Bovinbefunde nach Komitaten, bezogen auf sämtliche in dem betreffenden Komitat untersuchte Fälle.

Die Beurteilung der Beschäftigung stiess mitunter auf Schwierigkeiten. Als Arbeiter betrachteten wir lediglich den Fabrikarbeiter und als Bauern den Mann oder die Frau, die sich tatsächlich mit Ackerbau und Viehzucht befassen. Alle anderen Beschäftigungen — mit Ausnahme der Intelligenzberufe — reihten wir in die Spalte »Sonstige« ein. Hier sind daher die Gewerbetreibenden, Schaffner, Pförtner, Soldaten, Eisenbahner usw., sowie die unbeschäftigten (im Haushalt lebenden) Frauen und Angehörigen der Arbeiter, Bauern und Intelligenzler aufgearbeitet. Bei der Beurteilung nach Wohnorten berücksichtigten wir nicht die Arbeitsstätte, sondern die angemeldete Wohnung.

Die in unseren Untersuchungen gefundenen Resultate haben wir in Tabellen zusammengefasst. Tabelle I zeigt die Angaben der unter 1, 2 und 3 angeführten Gesichtspunkte. Diese Tabelle enthält — neben den Angaben ungarischer Autoren — auch die neuesten Resultate ausländischer Verfasser.

Bei der Bewertung hängt der Bovinprozentsatz auch von der Verteilung des Untersuchungsmaterials ab. In dem aufgearbeiteten Material spielt das Verhältnis zwischen dem aus Erkrankungen der Lunge und den extrapulmonalen Erkrankungen stammenden Untersuchungsmaterial eine wesentliche Rolle,

TABELLE I

	Bovin %	Lungen-Bovin %	Extrapulm. Bovin %
Holm (Dänemark) 1946	—	5,5	13—34
Wiesmann (Schweiz) 1949	9,6	—	—
Mc Kay (Schottland) 1951	—	12—13	—
Gordon (England) 1949	—	—	50
Christiansen (Dänemark-Jütland) 1951	—	4,9	18—49
Müller (Deutschland) 1951	—	—	20—80
Szüle (Ungarn, Kom. Tolna) 1938	3,4	1	—
Kneffel (Ungarn) 1943	8,2	5—6	14—19
Szabó (Ungarn) 1950—51	6,9	4,4	36

TABELLE II

Die Verteilung der Infektionen des Bovintyps in %, bezogen auf sämtliche Erkrankungen (des human + des Bovintyps)

Geschlecht		Beschäftigung				Wohnort	
♂	♀	Arbeiter	Bauer	Intelligenzler	Sonstige	Land	Stadt
7,5	6,3	5,9	10,8	4,7	6,2	7,6	6,2

dieses wird jedoch von den meisten Verfassern überhaupt nicht mitgeteilt, weshalb bei uns der Vergleich nicht real ist. In unseren Untersuchungen betrug — wie erwähnt — das aus extrapulmonalen Erkrankungen stammende Untersuchungsmaterial 6%, was etwa dem Landesdurchschnitt entspricht. In *Kneffels* Untersuchungen ist das extrapulmonale Vorkommen 24%, in den von *Szüle* 6%. — Unsere nach den unter 4, 5 und 6 angeführten Gesichtspunkten aufgearbeiteten Ergebnisse werden in Tabelle II veranschaulicht. Diese Angaben beleuchten das Bovinproblem in Ungarn von mancher neuen Seite. Da wir bei anderen Verfassern keine solchen Angaben fanden, waren wir nicht in der Lage, diese zu vergleichen. Wenn wir das Verhältnis der Bovinerkrankungen nach Beschäftigungen — bezogen auf sämtliche Bovinfälle — untersuchen, fällt die höhere Erkrankungsziffer der Bauernschaft auf. Die Ursachen hierfür kennen wir: hier erwähnen wir nur die bekannteste — die Beschäftigung mit Tieren, insbesondere mit Rindern.

Abb. 1 weist auf jene Gegenden hin, die wir vom Gesichtspunkt der Bovininfiziertheit besonders beachten müssen, doch betrachten wir diese Ergebnisse — infolge der auf ein Komitat entfallenden verhältnismässig niedrigen

Zahl von Untersuchungen — nur als solche informatorischen Charakters, weshalb wir hieraus keine weitergehenden Schlussfolgerungen ziehen.

Die höchste Bovin—Erkrankungsziffer fanden wir in den Komitaten Csongrád und Békés, die niedrigste in Zala, Vas und Fehér. *Auf Grund des Gesagten betonen auch wir, dass der Kampf gegen die Tuberkulose des Menschen gemeinsam mit dem gegen die Rindertuberkulose geführt werden muss, was wiederum die engste Zusammenarbeit auf ärztlichem und tierärztlichem Gebiet erfordert.* Es ist klar, dass wir den modernen Ausbau des Kampfes gegen die Tier-, insbesondere gegen die Rindertuberkulose bzw. die Förderung der Milchhygiene als einen

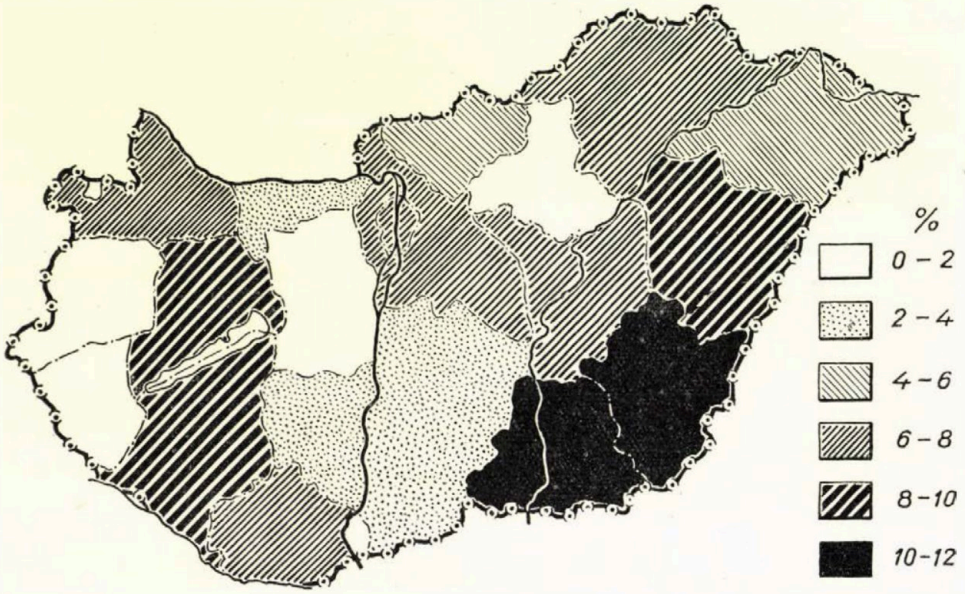


Abb. 1. Vorkommen des Bovintyps nach Komitaten (1950).

wichtigen Punkt der weiteren Entwicklung der Bekämpfung der Tuberkulose anzusehen haben.

LITERATUR

1. *Griffith, C.:* J. Hyg. **43,** 229 (1943).
2. *Cutbill, C.:* Brit. Med. J. 283 (1944).
3. *Hedvall, E.:* Acta Med. Scand. Suppl. 135 (1942).
4. *Holm, J.:* Acta Tbc. Scand. **19,** 710 (1945).
5. *Madsen, S.:* Acta Tbc. Scand. Suppl. 6 (1942).
6. *Gigon, A.:* Schweiz. Med. Wschr. 532 (1947).
7. *Kalbfleisch:* D. Gesundh. 655 (1948).
8. *Hohn:* Vet. Bull. **58,** (1948).
9. *Francis, F.:* Lancet. **1,** 34 (1950).
10. *Manninger, R.:* Tbc. Küzd. **4,** 6 (1940). (Ungarisch.)
11. *Kemény, L.:* Népegészségügy, **21,** 1112 (1940). (Ungarisch.)

12. *Vásárhelyi, J.:* Népegészségügy, **21,** 1105 (1940). (Ungarisch.)
13. *Kneffel, P.:* EME. Orv. Szak. Értesítő 55 (1943). (Ungarisch.)
14. *Francis, F.:* The bovine Tbc. 1948. London.
15. *Szüle, D.:* Gyógyászat. 78 (1938). (Ungarisch).
16. *Gordon, J.:* Brit. Vet. J. 14 (1949).
17. *Klimmer:* Milchkunde u. Milchhyg. 1951.
18. *Wisler:* Zit. Wezl. Bekämpf. Tub. d. Rindes. 1950. Hannover.
19. *McKay:* Veterin. Record **63,** 514 (1951).
20. *Hoeden, van der:* Tyd. Eiergenes. **64,** (1937).
21. *Berencsi, G.:* Pneum. Danub. 1—2. (1948). (Ungarisch.)
22. *Roth:* Schweiz. Zschr Path. Bakt. **12,** 5 (1949).
23. *Benda, R.:* La Semaine des Hôpitaux **40** (1951).

ДАННЫЕ О РАСПРОСТРАНЕННОСТИ ТУБЕРКУЛЕЗА БЫЧЬЕГО ТИПА В ВЕНГРИИ

И. Сабо

Резюме

Автор производил классификацию типов на основании 2296 положительных культур. Материал был собран со всей территории страны, пропорционально численности населения. Внелегочный материал составил 6% всех исследований, что соответствует встречаемости внелегочного туберкулеза в Венгрии. Классификацию типов автор производил на твердой среде Löwenstein—Jensen, содержащей 0,75% глицерина. Кроликам он вводил внутривенно по 0,01 мг. подозрительной на бычий тип культуры. Разработав результаты по полу, занятию, местожительству, областям и по происхождению материала (легочный, внелегочный), автор составил таблицы.

NEUE GESICHTSPUNKTE BEI DER ISOLIERUNG VON ANTIBIOTIKA ERZEUGENDEN BODENMIKROBEN

Von
I. SZABÓ

Biologisches Forschungsinstitut der Ungarischen Akademie der Wissenschaften, Tihany

(Eingegangen am 4. Oktober 1953)

Die agronomische und pharmazeutische Bedeutung der antibiotische Stoffe erzeugenden Mikrobenstämme hat das allgemeine Bestreben mit sich gebracht, Mikroorganismen dieser Art in möglichst grosser Zahl ausfindig zu machen. Antagonisten wurden bereits aus verschiedenen Medien isoliert, ihre wichtigsten Quellen blieben jedoch stets die natürlichen und kultivierten Böden. Die Forscher versuchten vor allem jene Zusammenhänge zu erkennen, die zwischen den antibiotischen Mikroorganismen und ihren Standorten bestehen. Infolge der grossen praktischen Bedeutung des Antibiotikumproblems wurden zwecks möglichst baldiger Ermittlung dieser Zusammenhänge viele Tausende von Bodenproben fast aller Weltteile in dieser Hinsicht überprüft. Diese Forschungen umfassten von den nördlichen, im grössten Teil des Jahres gefrorenen Böden bis zu den tropischen Bodentypen fast sämtliche Bodenarten. Man studierte die Böden der verschiedenen Kontinente und berücksichtigte dabei die klimatischen, bodenchemischen und physikalischen Eigenschaften sowie die geographische Lage und andere charakteristische Standortseigenschaften der untersuchten Böden [1, 2, 3, 6, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17].

Aus diesen Forschungen liessen sich aber hinsichtlich der oben erwähnten Zusammenhänge bis zum heutigen Tage keine sicheren Schlüsse ableiten. *Routien* und *Finlay* [16] stellten in ihrer zusammenfassenden Arbeit fest, dass die Auswahl der Böden oft aufs Geratewohl erfolgte. Manche Forscher verwendeten lokale Böden, andere dagegen sammelten welche aus allen Teilen der Welt. Wenn wir indessen die Literatur dieses Problems bis zum heutigen Tage verfolgen, so werden wir feststellen können, dass sich bisher die folgenden vier mehr oder weniger begründeten Auffassungen herausgebildet haben.

1. Manche Forscher sind der Ansicht, dass die Zahl der Antibiotika erzeugenden, aktiven Mikroben in jenen Böden am grössten ist, die für ihre Entwicklung günstige Verhältnisse bieten. Andererseits ist die mikrobiologische Aktivität im allgemeinen in der Nähe der Wurzeln (Rhizosphäre) stärker als in der wurzelfernen Zone. Die Untersuchungsergebnisse von *Rouatt* und seinen Mitarbeitern [15] berichten über die gesteigerte antibiotische Aktivität der Aktinomycesstämme in der Rhizosphäre.

2. *Landerkin* und seine Mitarbeiter [11] kamen bei der Untersuchung der aus nordkanadischen Böden stammenden Aktinomyceten zu der Feststellung, dass die höhere Zahl der in den Böden der nördlichen Gegenden auffindbaren Antagonisten mit der spärlichen Vegetation sowie mit der klimatisch bedingten längeren Zeitdauer des Stillstandes der Pflanzenentwicklung in Beziehung gebracht werden kann.

3. *Krassilnikow*, *Korenjako* und *Artamonowa* [10] haben aus Böden der Sowjetunion Aktinomycesarten isoliert und fanden dabei, dass die an Humus und organischen Stoffen reichen Böden viele Antagonisten enthalten. Nach ihren Feststellungen sollte die Lösung der Frage der Verbreitung der Antagonisten eher mit den ökologischen als mit den geographischen Faktoren in Beziehung gebracht werden. Sie wiesen ebenfalls nach, dass die Pflanzendecke auf die quantitative Verbreitung der antagonistischen Aktinomyceten keinen bedeutenden Einfluss ausübt.

4. Mehrere Forscher betonen neben der Wichtigkeit der ökologischen auch die Bedeutung der geographischen Faktoren bei der Verbreitung der Antagonisten. Die diesbezüglichen Forschungen hält besonders *Gause* [4] für sehr wichtig. *Awraamowa*, *Gawrilina* und *Sweschnikowa* [1] untersuchten innerhalb der Grenzen derselben geographischen Zone die Bodenmikroben (Pilze) der Rhizosphäre und der wurzelfernen Zone. Im Prozentsatz ihres Vorkommens, ihres Wirkungsspektrums und in der Stärke der antibiotischen Wirkung der antagonistischen Formen konnten sie keine wesentlichen Unterschiede nachweisen. Hingegen wiesen die aus den Böden der Moskauer Umgebung isolierten Antagonisten von denen, die aus den Böden der südlichen Krim isoliert wurden, deutliche Unterschiede auf. Im Süden ist ein höherer Prozentsatz der antagonistischen Formen mit viel breiterem Wirkungsspektrum und viel grösserer Wirkung zu beobachten.

Im allgemeinen gibt die Mehrheit der Verfasser nur den Standort und die Anzahl der isolierten Antagonisten an. Auf die weiteren Zusammenhänge weisen sie jedoch nicht hin. Der Zweck der vorliegenden Erörterungen besteht darin, auf diesem Gebiete eine gewisse Orientierung zu ermöglichen.

Untersuchungsmethoden

Die überwiegende Mehrzahl der Forscher prüfte die antibiotische Aktivität fast ausschliesslich in bezug auf einige in der internationalen Praxis verbreitete Mikroorganismen verschiedener Empfindlichkeit (E. coli, Staph. aureus usw.). Diese Organismen jedoch lebten mit den fraglichen Bodenmikroben nicht nur in keiner Biozönose zusammen, sondern sie konnten selbst in deren Leben innerhalb des Bodens keine Rolle spielen. Demgegenüber muss die Aufklärung der antagonistischen Verhältnisse der Mikroorganismen, die sich längere Zeit hindurch gegenseitig beeinflussten, zum Verstehen der antagonistischen Phänomene von entscheidender Bedeutung sein. Deswegen untersuchten wir die gegenseitige antibiotische Aktivität der von uns isolierten Arten.

Die Bodenproben wurden nach Möglichkeit aus einem kleinen Umkreis genommen, um die Isolierung der in den entfernteren Räumen des Bodens lebenden, zeitlich und räumlich in keine gegenseitige Berührung gekommenen Stämme zu vermeiden. Es wurde hierbei auch in

Erwägung gezogen, dass wenn man die Isolierung aus einem zu kleinen Bodenpartikel von mikroskopischer Grösse vornimmt, die in den Mikrobiozönosen zustande kommenden Resistenzverhältnisse die spätere Auswertung stören könnten. Deshalb holten wir die Proben aus den einzelnen Böden in einem Umkreis von etwa 6—8 cm mit Hilfe eines sterilen Spatens heraus. Die Tiefe der Probeentnahme war ungefähr 20 cm. Die einzelnen Proben wurden mittels Schüttelmaschine mit sterilem Brunnenwasser vermengt, verdünnt und auf einen auf pH 7 eingestellten Nährboden, dessen Temperatur ungefähr 45°C betrug, abgeimpft.

Bei der Isolierung verwendeten wir zwei verschiedene Nährböden, u. zw. bei Isolierung der Aktinomyceten den Jensenschen Dextrose-Kasein-Nährboden, bei Isolierung der übrigen Bakterien Pepton-Dextrose-Bodenextrakt-Agar. (Zusammensetzung: Bodenauszug: 26 ml; Bouillon: 237 ml; destilliertes Wasser: 237 ml; K_2HPO_4: 1 g; $MgSO_4$: 0,2 g; NaCl: 0,1 g; $FeSO_4$: in Spuren, Dextrose: 5,0 g; Pepton: 5,0 g; $(NH_4)_2HPO_4$: 2,5 g; Agar: 10,0 g).

Von den Platten sonderten wir jede selbständige Kolonie ab, und von diesen stellten wir je eine Kultur her. Für die weitere Züchtung sowohl der Aktinomyceten als auch der übrigen Bakterien wurde der zweite Nährboden, nämlich das angereicherte Bodenauszug-Agar benützt, welche diesen Mikroben als gute Nahrungsquelle diente. Die Vergleichsversuche wurden auf folgender Weise ausgeführt: es wurde eine Suspension der auf ihre Empfindlichkeit zu prüfenden Bodenmikroben mit sterilem Brunnenwasser hergestellt und davon 1 ml mit auf 45°C abgekühltem angereichertem Bodenauszug-Agar (pH 7) vermengt. Wir arbeiteten dabei natürlich immer mit den gleichen Bakterienmengen. Sodann wurde in eine Petrischale je eine Platte gegossen und auf deren erstarrte Oberfläche die als Antagonisten ausgewählten Organismen mit Hilfe einer Platinöse übertragen. Bei diesen Vergleichsversuchen verwendeten wir stets 30—35 Stunden alte Bakterienkulturen und 4—6 Tage alte Aktinomyces-Kulturen. Die Ergebnisse wurden nach 24 und nach 48stündiger Inkubation im Thermostat, der auf 28°C eingestellt war, abgelesen und die Qualität sowie Intensität der Hemmung und Förderung aufgezeichnet.

Vor dem Beginn der Gegenüberstellung der Mikroben führten wir mit den isolierten Stämmen eine Selektion durch. Zweck dieser Selektion war die Vermeidung der mehrfachen Isolierung der Stämme derselben Arten. Dies stellte eine äusserst schwierige Aufgabe dar, da sie nicht nur eine Absonderung nach Arten bedeutete, sondern man innerhalb der Arten auch die Stämme verschiedener antibiotischer Aktivität berücksichtigen musste. Dieses Problem lösten wir in der Weise, dass wir die isolierten Stämme physiologisch, ferner von mikro- und makromorphologischen Gesichtspunkten aus untersuchten — von Fall zu Fall führten wir auch Bestimmungen betreffs der Artenzugehörigkeit durch —, und von denen, welche in jeder Hinsicht identisch waren, prüften wir weiterhin nur einen.

Bei den Gegenüberstellungen wurde die Ausstreuung der Aktinomyceten mittels Mycelien- und Sporensuspensionen ausgeführt.

Untersuchungsergebnisse

Die Bodenproben wurden von der Halbinsel Tihany und teilweise von Budapest beschafft. Hier folgt die Beschreibung der Bodenproben bzw. ihrer Standorte:

1. Ackerboden (Bezeichnung: Acker I) auf der Halbinsel Tihany, auf dem Gebiete westlich von «Belsőtó» (Binnensee). Zeitpunkt der Probeentnahme: 3. März 1952. Seit langer Zeit intensiv bearbeiteter Boden mit strukturell entsprechendem Zustand. Humusgehalt (nach Extraktion mittels NaOH wurde der Humusgehalt des Extraktes oxydimetrisch bestimmt) niedrig: 2,2%, pH: 7,0 (Kühnsche Methode, Bromthymolblau-Indikator). Aus der bezeichneten kleinen Bodeneinheit wurden im ganzen 32 Stämme isoliert. Darunter sind 26 Bakterienstämme ($Sz_{1—25}$ und Sz_{31}), 5 Aktinomycesstämme ($Sz_{26—30}$) und 1 Pilzstamm (Sz_{32}). Zwei isolierte Bakterienstämme (Sz_{16} und Sz_{25}) verloren früh ihre Entwicklungsfähigkeit, so wurden die Vergleichsversuche an 30 Stämmen ausgeführt (Tabelle I, 1).

2. Eine kleinere Bodenfläche unter einem gemischten Laub- und Nadelwaldbestand auf Süsswasserkalkstein, auf der Halbinsel Tihany, an einem grösseren Talhang westlich des «Akasztó»-Hügels. Zeitpunkt der Probeentnahme: 3. März 1952. Der Bestand wies eine reiche Gebüsch-Flora in seinem zweiten Horizont auf. Humusgehalt: 5,6%, pH: 7,2. Unberührter jungfräulicher Boden, mit einem verhältnismässig seichten fruchtbaren Bodenhorizont. Aus dem einzigen herausgekommenen Erdklumpen wurden im ganzen 24 Stämme isoliert, u. zw. 17 Bakterien- ($F_{1—17}$) und 7 Aktinomycesstämme ($F_{18—24}$). Tabelle I, 2.

3. Eichenwald von dem westlichen Teil der Halbinsel Tihany. Üppige Grasvegetation. Zeitpunkt der Probeentnahme : 3. März 1952. Humusgehalt : 2,9%, pH: etwa 6,6—6,8). Die pH-Werte im Laufe des Jahres sind beträchtlichen Schwankungen unterworfen (5,6—6,8). Aus dem von 18—20 cm Tiefe herausgehobenen Erdklumpen wurden insgesamt 22 Stämme isoliert, u. zw. 16 Bakterien- ($T_{1—16}$) und 6 Aktinomycesstämme ($T_{17—22}$). Ein Bakterienstamm (T_{11}) ging bald zugrunde; so wurden die Ergebnisse der Tabelle I, 3 mit 21 Stämmen erreicht.

4. Zwecks Mistbeet-Pflanzenanbau erzeugter Boden aus einem Treibhaus der Hauptstädtischen Gärtnerei, Zeitpunkt der Probeentnahme : 20. April 1953. Humusgehalt : 5,6%, pH : ungefähr 7,0. Aus dem hinsichtlich des Wachstums und der Aktivität der Mikroben optimalen Biotop wurden auf die oben erwähnte Weise 19 Mikrobenstämme isoliert, u. zw. 8 Aktinomyces- ($M_{1—8}$) und 11 Bakterienstämme ($M_{9—19}$). Die Angaben der Gegenüberstellungen sind in der Tabelle I, 4 zusammengestellt.

5. Unter anaeroben Umständen erzeugter Faulschlamm, reich an organischem Material, beschafft von den Budapester Kanalisationswerken am 20. April 1953. Aus einer kleinen Menge des verdichteten Schlammes wurden insgesamt 12 aerobe Mikroorganismen isoliert, u. zw. 8 Bakterien ($R_{1—8}$) und 4 Aktinomyceten ($R_{9—12}$). Versuchsangaben in Tabelle I, 5.

6. Ein schon seit mehreren Jahrhunderten kultivierter Acker auf der Halbinsel Tihany (wurde bereits von dem Personal des Klosters längere Zeit regelmässig bebaut). Zeitpunkt der Probeentnahme: 20. August 1953. Die strukturellen Verhältnisse des Bodens sind ungünstig. Die Klumpen werden bald pulverisiert und zerfallen infolgedessen sehr rasch. Humusgehalt niedrig: 1,6%, pH : 7,0. (Bezeichnung des Bodens Acker II.) Aus einem grösseren Klumpen wurden 11 Bakterien- ($P_{1—11}$), ferner 10 Aktinomycesstämme ($P_{12—21}$) isoliert. Versuchsangaben in Tabelle I, 6.

7. Der südliche, stark abfallende Berghang des «Óvár» (alte Burg) auf der Halbinsel Tihany, mit seichtem fruchtbarem Bodenhorizont. Zeitpunkt der Probeentnahme : 20. August 1953. Der Wirkung der Sonnenstrahlen stark ausgesetzte, oft austrocknende, dürre, niedrige Rasendecke. Humusgehalt : 4,5%, pH : 7,0. Es wurden im ganzen 16 Mikrobenstämme auf die erwähnte

TABELLE 1

Gegenseitiger Antagonismus der aus einem einzigen Klumpen verschiedener Böden isolierten Mikroorganismen auf künstlichem Nährboden

Nr.	Bezeichnung des Bodens	Die gegenübergestellten Mikroorganismen	Zahl der Gegenüberstellungen	Zahl der Hemmungen	
				Zusammen	%
1	Acker I	Bakterium ←→ Bakterium	576	152	26
		Aktinomyces ←→ Aktinomyces	25	4	16
		Bakterium ←→ Aktinomyces	240	65	27
		Pilz ←→ Bakt. Pilz, Aktinomyces ..	59	4	7
		Zusammen	900	225	25
2	Laub- und Nadelmischwald	Bakterium ←→ Bakterium	289	62	21
		Aktinomyces ←→ Aktinomyces	49	3	6
		Bakterium ←→ Aktinomyces	238	35	15
		Zusammen	576	100	17
3	Eichenwald	Bakterium ←→ Bakterium	225	40	18
		Aktinomyces ←→ Aktinomyces	36	3	8
		Bakterium ←→ Aktinomyces	180	28	15
		Zusammen	441	71	16
4	Mistbeetboden	Bakterium ←→ Bakterium	121	36	30
		Aktinomyces ←→ Aktinomyces	64	20	31
		Bakterium ←→ Aktinomyces	176	70	40
		Zusammen	361	126	35
5	Anaerober Schlamm	Bakterium ←→ Bakterium	64	12	19
		Aktinomyces ←→ Aktinomyces	16	1	6
		Bakterium ←→ Aktinomyces	64	14	22
		Zusammen	144	27	19
6	Acker II	Bakterium ←→ Bakterium	121	40	33
		Aktinomyces ←→ Aktinomyces	100	49	49
		Bakterium ←→ Aktinomyces	220	100	45
		Zusammen	441	189	43
7	Kahler Berghang des Óvár	Bakterium ←→ Bakterium	81	23	28
		Aktinomyces ←→ Aktinomyces	49	14	28
		Bakterium ←→ Aktinomyces	126	30	24
		Zusammen	256	67	26

Weise isoliert, u. zw. 9 Bakterien- (O_{1-9}) und 7 Aktinomycesstämme (O_{10-16}). Versuchsresultate: Tabelle I, 7.

Besprechung der Ergebnisse

Viele Mikrobiologen vertraten früher den Standpunkt, dass die Mikroorganismen unter natürlichen Verhältnissen im Boden keine antibiotischen Stoffe erzeugen. Diese Tätigkeit entfalten sie, nach dieser Meinung, nur auf künstlichen Nährböden. Später, als die weiteren Forschungen die Antibiotikumerzeugung im Boden bestätigten, beriefen sie sich darauf, dass die Rolle der antibiotischen Stoffe im Leben der Böden unbedeutend ist, da diese unter der Wirkung verschiedener Faktoren inaktiviert werden. Auf Grund dieser Auffassung vertraten manche Forscher die Ansicht, dass das Zustandekommen der antibiotischen Eigenschaften der Mikroorganismen im allgemeinen dem Zufall zuzuschreiben wäre.

TABELLE II

Grössenverteilung der durch die aus verschiedenen Böden gezüchteten Bakterien ausgelösten Hemmungszonen

Bezeichnung des Bodens	Zahl der Hemmungen	Radius der Hemmungen in mm		
		unter 2	2–5	über 5
Acker I	195	134	55	6
Laub- und Nadelmischwald	79	69	10	—
Eichenwald	62	56	6	—
Mistbeetboden	86	30	51	5
Anaerober Schlamm	23	21	2	—
Acker II	80	43	29	8
Kahler Berghang des Óvár	48	42	6	—

TABELLE III

Grössenverteilung der durch die aus verschiedenen Böden gezüchteten Aktinomyceten ausgelösten Hemmungszonen

Bezeichnung des Bodens	Zahl der Hemmungen	Radius der Hemmungen in mm		
		unter 2	2–5	über 5
Acker I	28	3	14	11
Laub- und Nadelmischwald	21	8	11	2
Eichenwald	9	9	—	—
Mistbeetboden	40	8	13	19
Anaerober Schlamm	4	2	2	—
Acker II	109	15	58	36
Kahler Berghang des Óvár	19	9	6	4

TABELLE IV

Prozentsatz der beobachteten Hemmungen bei der Gegenüberstellung der aus einzelnen Böden isolierten Mikroorganismen und durchschnittlicher Hemmungszonenradius der Bakterien- und Aktinomyces-Antagonisten

Bezeichnung des Bodens	Prozentsatz sämtlicher beobachteter Hemmungen	Durchschnittlicher Radius der Hemmungszonen in mm	
		Durch Aktinomyces-Antagonisten ausgelöst	Durch Bakterien-Antagonisten ausgelöst
Acker I	25	5,2	2,2
Laub- und Nadelmischwald	17	3,0	1,6
Eichenwald	16	1,4	1,6
Mistbeetboden	35	5,9	3,1
Anaerober Schlamm	19	2,5	1,5
Acker II	43	5,3	2,5
Kahler Berghang des Óvár	26	3,2	1,5

Jene bahnbrechenden Untersuchungen, die in der letzten Zeit von verschiedenen Forschern auf dem Gebiete der ursächlichen Erklärung des Zustandekommens der antibiotischen Eigenschaften der Mikroorganismen ausgeführt wurden, erwiesen klar, dass die Fähigkeit, antibiotische Stoffe zu erzeugen, während des Daseinskampfes der Mikroben entsteht. Nach dieser Auffassung spielen die Antibiotika als Kampfmittel eine recht bedeutende Rolle im Leben der Mikroorganismen.

Wenn wir jedoch den Zufall als primäre Ursache der Entstehung der antibiotischen Eigenschaften anerkennen, so wird schon a priori unmöglich, dass wir die Zusammenhänge zwischen den typischen Bodeneigenschaften und der antibiotischen Aktivität seiner Mikroorganismen erfassen können.

Die antibiotische Stammforschung kann keine anderen Leitprinzipien haben als die Einheit des Organismus und seiner Umgebung. Alle Eigenschaften des Organismus müssen daher mit seiner Umgebung als eine Einheit betrachtet werden. Wenn wir daher das Zustandekommen der antibiotischen Fähigkeit der Mikroorganismen mit den wichtigsten Faktoren ihres Biotops in logischen Zusammenhang bringen wollen, so müssen wir nach meiner Ansicht auch die Anwendung der geschichtlichen Betrachtung in Erwägung ziehen.

Nun sollen die Angaben der Tabelle I betrachtet werden. Wie ersichtlich, wurden bei sämtlichen Böden die daraus isolierten Bakterien und Aktinomyceten untereinander und gegenseitig gegenübergestellt. Die meisten Mikroben isolierten wir aus «Acker I», die wenigsten aus dem «anaeroben Schlamm». Bei den einzelnen Böden schwankten die Gesamthemmungsprozente zwischen 43 und 16%. Tabelle II und III stellen die Grössenverteilung der Hemmungszonen dar, wäh-

rend Tabelle IV die in Millimetern ausgedrückten Zahlenwerte des durchschnittlichen Hemmungszonenradius angibt. Diese Daten weisen darauf hin, dass die Actinomyceten in den meisten Fällen aktiver sind als die Bakterien und dass die hochwirksamen Antagonisten im allgemeinen am häufigsten zwischen den Aktinomyceten vorkommen.

Es ist nicht schwer festzustellen, dass die «antibiotische Aktivität» der Böden, d. h. die Aktivität ihrer Mikroflora, mit dem Humusgehalt meistens nicht parallel läuft. Hinsichtlich dieser Zusammenhänge müssen wir hier auf einen Faktor hinweisen, den wir mit den bisherigen naturwissenschaftlichen Methoden nicht erfassen können, nämlich auf den geschichtlichen Werdegang des Bodens. Auf Grund unserer Untersuchungsangaben folgerten wir, dass die antibiotische Aktivität jener Böden am intensivsten ist, die auch sonst ein recht lebhaftes und wirksames Bodenleben aufweisen. So ist «Acker II» einer der ältesten Ackerböden der Halbinsel Tihany und wurde nach den von mir ermittelten geschichtlichen Daten mit verhältnismässig ausgiebigen Mengen organischer Düngemittel versorgt. Die in einem einzigen Klumpen dieses Bodens lebenden Mikroorganismen wirkten auf küntslichem Nährboden in 43% der Fälle gegenseitig hemmend. Die durchschnittlichen Hemmungswerte sind ebenfalls hoch, obwohl der Humusgehalt dieses Bodens von allen Proben der geringste war, nämlich nur 1,6%. Nach unseren Feststellungen bewahrte die in der Vergangenheit längere Zeit hindurch tätige Mikroflora trotz des schlechten strukturellen Verhältnisses und Humuszustandes des Bodens ihre antibiotische Aktivität, die sie vorher erreicht und in ihrem Plasma konservativ und vererblich fixiert hatte. Der Mistbeetboden, welcher für die Tätigkeit der aeroben Mikroorganismen der geeignetste Biotop ist, enthält neben grösserem Humusgehalt eine sehr aktive Mikroflora. «Acker I» ist kein so alter Kulturboden wie «Acker II», doch wurde seine Dynamik durch agrotechnische Eingriffe recht intensiv gestaltet. Seine antibiotische Aktivität ist ebenfalls stark. Die Böden des Eichen- und des gemischten Laub- und Nadelwaldes zeigen eine weniger intensive biologische Bodenaktivität. Beim ersteren sinken die pH-Werte im Laufe des Jahres oft unter 6,0. Beide Bodentypen sind unberührte jungfräuliche Böden. Ihre antibiotische Aktivität ist trotz des grösseren Humusgehaltes gering. Der anaerobe Schlamm, mit seinem grossen Gehalt an organischen Stoffen, enthält eine inaktive Mikroflora, weil sich unter den dort herrschenden anaeroben Bedigungen keine aeroben Organismen und somit auch keine antagonistischen Konkurrenzverhältnisse entwickeln konnten. Schliesslich vermochte auch der trockene Boden des Berghanges «Óvár» keine Mikroflora von stärkerer antibiotischer Aktivität zustande zu bringen. Die Intensität des letzteren war im allgemeinen immer niedriger als die der ein recht aktives Leben führenden Ackerböden.

Ich möchte noch erwähnen, dass die Böden von starker bzw. geringer antibiotischer Aktivität der Halbinsel Tihany nicht mehr als ein bis zwei Kilo-

meter voneinander entfernt sind. Sie gehören also zweifellos derselben geographischen Zone an.

Wir sind davon überzeugt, dass die grössere antibiotische Aktivität der kultivierten Böden mit ihren besonderen biotischen Verhältnissen in engem Zusammenhang steht. Nach *Krassilnikow* [9] kommen die Mikroorganismen im Boden in kleinen Haufen vor, die aus Individuen einer oder mehrerer, miteinander nicht konkurrierenden Arten bestehen. Diese Individuen sind miteinander durch fast sämtliche Formen der Meta- und Symbiose verkettet. Durch die agrotechnischen Massnahmen wird natürlich die Biodynamik der Ackerböden recht bedeutend gesteigert. Die Haufen, diese kleinsten mikroskopischen Biozönosen der Böden, zerfallen infolge des Pflügens und anderer mechanischer Eingriffe, sie vermengen sich mit den Individuen anderer Mikrobenhaufen sowie konkurrenter Arten und kämpfen äusserst scharf gegeneinander. Diese Vorgänge ermöglichen das Zustandekommen jener metabiotischen Haufensysteme, welche die Nährstoffvorräte des Bodens besser ausnützen können. Es kann im allgemeinen festgestellt werden, dass im Bodenleben alle Faktoren, die die Tätigkeit der Mikroorganismen steigern und diese dauernd auf einem hohen Niveau halten, auch die Möglichkeiten zu einem recht intensiven Existenzkampf der Mikroben herbeiführen. Während der Zeit dieses ununterbrochenen Kampfes entstehen und fixieren sich die antibiotischen Eigenschaften. Je beständiger die Einwirkung der Konkurrenz, desto mehr steigert sich das Mass der Antibiotikumproduktion, wie dies experimentell bereits festgestellt wurde.

Schliesslich soll noch erwähnt werden, dass bisher noch keine Angaben darüber vorhanden sind, in welcher Zeitspanne unter den Saprophyten in nichtsterilem Boden eine Antibiose zustande kommen kann. Wenn aber die antibiotischen Eigenschaften bereits zustande gekommen sind und erblich fixiert wurden, so werden diese auch dann bestehen, wenn die ursprünglichen Entstehungsbedingungen nicht mehr vorhanden sind. Wird ein an organischen Nährstoffen reicher Boden verarmen, so wird unserer Ansicht nach keine Verringerung der antibiotischen Aktivität der Mikroflora erfolgen.

Schlussfolgerung

Wir führten Untersuchungen hinsichtlich des Antagonismus von Mikroorganismen durch, die sich — möglicherweise — in ihrer geschichtlichen Vergangenheit gegenseitig beeinflussen konnten. Diese Untersuchungen lassen darauf schliessen, dass zwischen dem Bodentyp und dem antibiotischen Verhalten seiner Mikroflora ein enger Zusammenhang besteht. Dieser Zusammenhang soll nicht allein in den geographischen Faktoren oder in dem augenblicklichen Humusgehalt gesucht werden, sondern auch in der jeweiligen Gestaltung der mikrobiologischen Aktivität des Bodens in der Vergangenheit. Die geschichtliche Vergangenheit

der Böden spiegelt sich im Charakter der darin lebenden Mikroorganismen wider. Auch weniger fruchtbare oder an organischen Stoffen arm gewordene Böden können eine Mikroflora von starker antibiotischer Aktivität enthalten, wenn diesen Böden früher Gelegenheit zur Ausbildung solcher Eigenschaften geboten wurde oder von aussen kommende antibiotische Mikroorganismen — die durch Wind, Wasser und andere Faktoren dorthin gelangt sind — sich anhäufen konnten.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Wir untersuchten an künstlichen Nährböden den Antagonismus der in kleinen Einheiten (Klumpen) verschiedener Böden lebenden Mikroorganismen, die sich — möglicherweise — früher während ihrer geschichtlichen Vergangenheit gegenseitig beeinflussen konnten.

2. Auf Grund der Auswertung der Ergebnisse von mehreren tausend Gegenüberstellungen kamen wir zu dem Schluss, dass zwischen dem Bodentyp und der antibiotischen Aktivität seiner Mikroflora ein enger Zusammenhang besteht.

3. Dieser Zusammenhang soll nicht nur in geographischen Faktoren oder in dem augenblicklichen Gehalt an Humus bzw. an organischen Stoffen, sondern auch in der geschichtlichen Vergangenheit der Böden gesucht werden. Eine durch längere Zeitdauer anhaltende mikrobiologische Aktivität eines Bodens wird bestimmt durch die dort entstehenden Konkurrenzverhältnisse, die die Bedingungen zur Anhäufung der antagonistischen Stämme hervorrufen. Diese intensive «antibiotische Aktivität der Böden» kann auch dann längere Zeit bestehen bleiben wenn jene Umstände, die die Akkumulation der Antagonisten verursachten, nicht mehr vorhanden sind.

LITERATUR

1. *Авраамова, О. П., Гаврилина, Г. В., Свешникова, М. А.:* Бюлетень М. О-ва Исп. Природы, Отд. Биологии, 58, 4 (1953).
2. *Colligan, D.:* Butler University Botanical Studies, 9, 9 (1949).
3. *Duggar, B. M.:* Trans. N. Y. Acad. Sci., Ser. 2, 12 (1950).
4. *Гаузе, Г. Ф.:* Лекции по антибиотикам. Москва (1953).
5. *Gillisen, G.:* Zbl. Bakter. I. Ref. **151,** 161 (1953).
6. *Harley, J. L.:* Biol. Revs. Cambridge, Phil. Soc., 23, 127 (1948).
7. *Hosoya, S.* et all.: Japan. J. Exp. Med. **20,** 473 (1950).
8. *Katznelson, H., Lochhead, A. G.* and *Timonin, M. I.:* Botan. Rev. 14, 543 (1948).
9. *Красильников, Н. А.:* Изв. Акад. Наук СССР. Сер. Биол. 1, 193, (1936).
10. *Красильников, Н. А.,* Кореняко, А. И., Артамонова, О. И.:Микробиология, 22, 1, 3 (1953).
11. *Landerkin, G. B., Smith, J. R. G.* and *Lochhead, A. G.:* Can. J. Research. (C). 28 (1950).
12. *Нахимовская, М. И.:* Микробиология, 6. 131 (1937).
13. *Ордин, А. П.:* Микробиология, 21, 2, (1952).
14. *Rosenfeld, W. D.* and *Zobell, C. E.:* J. Bact., 54, 393 (1947).
15. *Rouatt, J. W., Lechevalier, M.* and *Waksman, S. A.:* Antibiotics and Chemotherapy, 1, 185 (1951).
16. *Routien, J. B.* and *Finlay, A. C.:* Bacteriol. Reviews, **16,** 2 (1952).
17. *Schatz, A.* and *Hasen, E. L.:* Mycologia, 40, 461 (1948).
18. *Стрешинский, М. О.:* Докл. Акад. Наук СССР, 75, 2 (1950).
19. *Василенко, А. Г.:* Г.: Микробиология, 21, 671 (1952).
20. *Waksman, S. A.:* The Actinomycetes. Chronica Botanica Company, Waltham, Massachusetts. 230 (1950).
21. *Wallhäuser, K. H.:* Arch. f. Mikrobiol., **16,** 201 1951).

НОВЫЕ ТОЧКИ ЗРЕНИЯ ПРИ ПОИСКАХ ПОЧВЕННЫХ МИКРОБОВ, ОБРАЗУЮЩИХ АНТИБИОТИКИ

И. Сабо

Резюме

Исследования по открытию закономерностей в почвенных местонахождениях и скоплениях микробов, образующих антибиотики, не привели к единогласным результатам. Многие считают, что почвы, благоприятствующие жизнедеятельности микробов, являются наиболее богатыми антибиотиками, другие обнаружили большое количество антагонистов в инактивных почвах. По мнению третьих, поиски должны производиться в почвах с богатым содержанием органических веществ, однако, и в почвах, малосодержащих таковые, тоже могут встречаться богатые залежи. Ризосфера дает возможность скопления антагонистов, в некоторых случаях, однако, оказывается, что именно такая сфера препятствует образованию антибиотических популяций.

В связи с данной проблемой авторы сравнивали антибиотическую активность микрофлор семи видов почв, резко отличных в отношении физикохимических условий. Исходя из ряда экспериментальных определений, доказывающих, что антибиотические свойства образуются в процессе борьбы за существование, что свойства эти — возникающие в природе — позже выявляются также и на искусственных средах, далее, что антибиотическое действие часто направляется специфически против конкурента, авторы разработали новый сравнительный метод, согласно которому из каждой почвы берется только по одному более крупному комку весом в несколько грамм, и из таковых изолируются бактерии и актиномицеты, т. е. дело имеется с такими микробами, которые в историческом прошлом могли взаимно действовать один на другого. На твердой питательной среде авторы изучали антагонистическое взаимодействие выделенных таким образом микроорганизмов. Результаты демонстрированы на таблицах. Между почвами наблюдались резкие разницы в процентах случаев торможения, в средних значениях тормозящих зон, выраженных в мм. По мнению авторов эти характерные отличия не могут объясняться физикохимическими условиями исследуемых почв в данный момент и в особенности не зависят от принимаемой так часто в расчет гумусной почвы. Именно в почве с наиболее низким содержанием гумуса авторы обнаружили большинство случаев торможения, параллельно с высокой активностью. Объяснение они находят в историческом прошлом почв. На основании проведенных экспериментов авторы определили, что если причины, благоприятствующие образованию и скоплению антагонистов (содержание органических веществ, благоприятная динамика почвы, условия конкуренции) прекращаются, (как, например, ухудшение динамического состояния почв, истощение органических веществ) не наступает немедленного разноса высокоантагонистических популяций, так как физикохимические силы почв могут поддерживать аккумуляции еще на более или менее короткое время в зависимости от типа почв.

VEGETATIVE HYBRIDISATIONSVERSUCHE AN STREPTOMYCES

Von
J. HORVÁTH, M. MARTON und I. OROSZLÁN

Biologisches Forschungsinstitut der Ungarischen Akademie der Wissenschaften, Tihany, und Mikrobiologischer Lehrstuhl der Agrarwissenschaftlichen Universität, Gödöllő

(Eingegangen am 16. Oktober 1953)

In der medizinischen Mikrobiologie wird zur gelenkten Umgestaltung der Arten die vegetative Hybridisation oder — wie es in der westlichen Literatur heisst — Transformation seit langer Zeit als anerkannte Methode benutzt. Diese Forschungsrichtung begann mit der Untersuchung der Parastämme. Anfangs wurde nur das Vorhandensein der Parastämme festgestellt, doch war man vergebens bestrebt, sie herzustellen [5, 21, 31, 36, 39, 40, 41, 42, 43, 50]. *Griffith* [19] war der erste, der Parastämme von Pneumokokken herzustellen vermochte. In seinem berühmt gewordenen Versuch impfte er Mäuse mit der Mischung von 2 Pneumokokkenstämmen. Einer dieser beiden war ein avirulenter Stamm vom R-Typ, der andere ein vorher mit Hitze abgetöteter virulenter Stamm vom S-Typ. Die Mäuse verendeten an Septikämie, und aus ihnen gelang es *Griffith*, den virulenten S-Typ-Stamm zu kultivieren. Auf das erfolgreiche Experiment von *Griffith* folgte eine grosse Zahl von anderen ebenfalls erfolgreichen Versuchen [1, 4, 8, 11, 12, 16, 22, 35, 45 und viele andere]. Die Zahl der diesbezüglichen experimentellen Arbeiten ist so bedeutend, dass bereits Monographien und zusammenfassende Abhandlungen darüber erschienen sind. Auch in zusammenfassenden genetischen Arbeiten widmen die Verfasser diesen Forschungen besondere Kapitel [3, 8, 10, 23, 25]. In der ungarischen Forschung stammen die bahnbrechenden Arbeiten von *Manninger* und *Nógrádi* [34], *Havas* [18] und *Balassa* [6].

Die Bezeichnung vegetative Hybridisation ist neueren Datums. In Verbindung mit der Arbeit von *Gratschewa* [16] setzte *Gamaleja* [14] zuerst auseinander, dass der bisher als Transformation bezeichnete genetische Vorgang bei den Mikroorganismen eigentlich eine vegetative Hybridisation sei. Seit der denkwürdigen Diskussion in der nach Lenin benannten Landwirtschaftlich-Wissenschaftlichen Akademie im August 1948 hat diese Bezeichnung in der Sowjetunion in weiten Kreisen Verbreitung gefunden.

Das Wesen der Methode lässt sich kurz in der Weise zusammenfassen, dass ein Teil der Eigenheiten einer Art in eine andere Art eingeführt wird. Zur Durchführung werden die mannigfaltigsten Kombinationen verwendet: der im nativen Zustand belassene zerstörte Körper oder in anderen Fällen der abgetötete Körper

der umgestaltenden Art wird an die umzugestaltende Art assimiliert, in weiteren Fällen ist die Methode die gemeinsame Züchtung oder aber eine gemeinsame Züchtung, bei der die beiden Arten räumlich isoliert sind. Neuerdings werden die Stämme mit Desoxyribonukleinsäure umgewandelt [23].

Die führende sowjetische Mikrobiologie wendet die vegetative Hybridisation zur Umwandlung der landwirtschaftlichen und industriellen Mikroorganismen, d. h. der Saprophyten-Mikroorganismen, bereits mit Erfolg an. So benutzte z. B. *Krassilnikow* [28] diese Methode bei den Knöllchenbakterien, *Kossikow* [27] bei Hefen, *Feniksowa* [13] beim Schimmel (Aspergillus) zur gelenkten Umwandlung der Eigenschaften, *Stresinski* [44] hingegen zum Hervorrufen des Antagonismus zwischen Penicillium und B. subtilis. Die Engländer *Savage* und *Florey* [38] versuchten — wenn auch ohne Erfolg — mit dieser Methode bei den Bakterien die antibiotische Eigenschaft zu beeinflussen.

Hinsichtlich der Anwendung dieser Methode auf dem Gebiet der industriellen und landwirtschaftlichen Mikroorganismen stellte die Schriftleitung der «Mikrobiologia» in einer 1952 veröffentlichten Zusammenfassung unter dem Titel «Die Endergebnisse der Diskussion über die Frage der Selektion der Mikroorganismen» folgendes fest: «Wenn auch letztgenannte Methode (d. h. die vegetative Hybridisation) in den mit der Gruppe der Darmbakterien durchgeführten Versuchen zu interessanten Ergebnissen führte, müssen die Aussichten dieser Methode auf dem Gebiet der Selektion der Mikroben doch noch geklärt werden.» Diese Feststellung gab uns die Veranlassung, bei unseren Versuchen zur gelenkten Umgestaltung der antibiotischen Eigenschaften der Streptomyces-Arten auch die vegetative Hybridisation anzuwenden und auf diese Weise auch unserseits zur Klärung der Aussichten dieser Methode beizutragen.

Material und Methoden

Eines der Arbeitsgebiete der Mikrobiologischen Abteilung des Biologischen Forschungsinstitutes der Ungarischen Akademie der Wissenschaften in Tihany war die Erforschung der Streptomyces-Arten. Mit diesem Forschungsgebiet steht die Frage des Konservativismus bzw. der Variabilität der isolierten antibiotischen Arten in organischem Zusammenhang. Jene Arten, welche wir in der ersten Hälfte (1950—51) unseres Fünfjahrplanes isolierten, hatten nämlich während der mehr oder weniger langen Zeit der Laboratoriumshaltung von ihren antibiotischen Eigenschaften meist viel eingebüsst. Besonders auffallend war bei zahlreichen der isolierten Arten, dass sie ihre auf Gram-negative Bakterien wirkenden Eigenschaften sozusagen alle verloren hatten. Die Fundorte dieser Streptomyces sind, wie wir dies in einer 1951 veröffentlichten Arbeit mitgeteilt hatten [20], verschiedene Wald-, Acker- und sumpfige Wiesenböden in der Umgebung des Balaton. In Fortsetzung unserer Forschungen auf demselben Gebiet konnten wir 1952 neuere Arten isolieren, von denen eine aus dem Eichenwaldboden der Tihanyer Halbinsel gewonnene Streptomyces-Art insofern wertvolle antibiotische Eigenschaften aufzuweisen schien, als sie auf vollkommen synthetischem Nährboden ein auf Gram-positive Bakterien wirkendes Antibiotikum in grösserer Menge erzeugte. Bedauerlicherweise nahm jedoch die Wirkstofferzeugung während der Kultivierungsversuche wesentlich ab, und bei der genauen Untersuchung konnten wir auch feststellen, dass die Art sowohl in morphologischer als auch in physiologischer Beziehung eine starke Variation aufweist.

Die Neigung zur hochgradigen Variabilität bei mehreren aus transdanubischen Arten isolierten Streptomyces sowie bei der vorstehend erwähnten, aus Tihanyer Eichenwaldboden isolierten Art machte uns klar, dass es ausserordentlich wichtig sei, uns mit der Frage der Stabi-

li ierung dieser Arten zu befassen. Zur Erreichung dieses Zieles brachten wir die Methode der vegetativen Hybridisation zur Anwendung.

Als erstes Versuchsobjekt verwendeten wir die aus dem Tihanyer Eichenwaldboden isolierte stark variable Streptomyces-Art. Er erschien uns nötig, eine Streptomyces-Art von entsprechender Umwandlungswirkung zu finden, mit der wir unsere stark variierende Art zu beeinflussen vermochten. Als Kriterium dieser Art stellten wir theoretisch folgende Anforderungen auf: die Art sei konstant, sowohl morphologisch als auch physiologisch nicht variabel, natürlich von antibiotischer Eigenschaft und auch auf Gram-negative Bakterien wirksam. Wir nahmen an, dass die günstige Umbildung einer labilen und in ihren Eigenschaften für unsere Zwecke mangelhaften Art (enges antibiotisches Spektrum, Fehlen des proteolytischen Enzyms, schwache Sporenbildung) nur in dem Falle möglich sei, wenn wir mit einer über zusätzliche und gleichzeitig konstante Eigenschaften verfügenden Art auf sie einwirken. Für diesen Zweck erschien uns eine aus einem natronhaltigen Boden der Ungarischen Tiefebene isolierte Streptomyces-Art geeignet.

Die zur Umbildung bestimmte Art war, wie oben bereits erwähnt wurde, aus Eichenwaldboden auf der westlichen Hochebene der Tihanyer Halbinsel isoliert worden. Wir bezeichneten diese Streptomyces-Art mit T3. Auf Grund der folgenden Bestimmungsmerkmale versuchten wir sie mit Hilfe des *Bergey*-Manuals und des *Krassilnikow*schen Werkes zu determinieren, vermochten aber nur soviel festzustellen, dass sie den Streptomyces (Actinomyces) globosus Krassilnikow nahesteht:

Synthetischer Glyzerin-Agar: (K_2HPO_4 0,1%; $MgSO_4$ 0,05%; KCl 0,05%; $FeSO_4$ 0,0001%; $NaNO_3$ 0,2%; Glyzerin 3%; Agar 1,5%; H_2O dest. [32]. Braungefärbte kleine Kolonien mit schwacher Sporenbildung, im Nährboden geben sie eine braune Farbe ab.

Bouillon-Agar: Graubraune Kolonien, starke braune Farbenbildung im Nährboden, vereinzelt mit weissen Luftmyzelien bedeckt.

Asparagin-Agar: Glukose 1%; Asparagin 0,05%; K_2HPO_4 0,05%; Fleischextrakt 0,5%; Leitungswasser [48]. Sich gut entwickelnde dunkelbraune Kolonien, die in den Nährboden gelblichgrüne Farbe abgeben.

Czapek-Agar: sich schwach entwickelnde winzige graue Kolonien, im Nährboden matte gelblichbraune Färbung.

Rüben-Agar: (Mohrrüben-Dekokt, KH_2PO_4 0,1%; Glukose 0,5%; Pepton 0,5%; Agar 2%); sich gut entwickelnde dunkelbraune Kolonien, mit grauen Luftmyzelien bedeckt, im Nährboden stark dunkelbraune Färbung.

Kartoffel-Block: Braune Kolonie, die im Nährboden eine intensiv schwarze Farbe abgibt; die Kolonien sind stellenweise mit gräulichweissen Luftmyzelien bedeckt.

Auf *synthetischen Nährböden* bildet sie gewöhnlich je nach der chemischen Zusammensetzung des Nährbodens einen wasserlöslichen grünen, bräunlichgelben und rotbraunen Farbstoff in flüssiger Kultur [19].

Gelatine verflüssigt sie nicht, im Nährboden gibt sie eine braune Farbe ab. In Zellulose findet keine Entwicklung statt, Stärke wird abgebaut und Saccharose nicht invertiert.

Mikrokultur: Verzweigende vegetative Hyphen, zwischen denen eigenartige rosettenförmige Bildungen zu sehen sind. Nach unseren Beobachtungen bilden einzelne Zweige dieser rosettenförmigen Bildungen verlängert die Sporenträger. Die Sporenträger sind gerade und enthalten fast kugelförmige Sporen.

Antibiotische Eigenschaft: Wirkt nicht auf Gram-negative Bakterien, erzeugt jedoch ein auf Gram-positive stark wirkendes Antibiotikum.

Ein besonderes Kennzeichen der Art ist ihre hochgradige Variabilität. Die Variation tritt, wie dies aus der beigefügten Aufnahme hervorgeht (Tafel I/3), in morphologischen Merkmalen in Erscheinung. Ihre Luftmyzelienbildungen haben einzelne Linien der eingespannten Art verloren; die Menge der Antibiotikum-Produktion variierte ebenfalls stark.

Die umwandelnde Art, die wir aus dem Gebiet zwischen Donau und Tisza aus einem natronhaltigen Boden isolierten, wurde mit der Bezeichnung Xj9 versehen und lässt sich nach dem Bestimmungsschlüssel von *Krassilnikow* in die Gruppe der Streptomyces (Actinomyces) globisporus einreihen. Hier folgt ihre Beschreibung (den Nährboden der einzelnen Proben siehe bei T_3):

Synthetischer Glyzerin-Agar: Weisse Kolonie mit starker Sporenbildung, gibt im Nährboden violettblaue Farbe ab.

Bouillon-Agar: Gräulich, mit weissen Luftmyzelien bedeckt. Im Nährboden gelblichbraune Farbenbildung.

Asparagin-Agar: sich schwach entwickelnde, mit weissen Luftmyzelien bedeckte Kolonie.

Czapek-Agar: sich schwach entwickelnder, weisser, mehliger Belag.

Rüben-Agar: sich gut entwickelnde hellbraune, stark sporenbildende zusammenhängende Kolonie; gibt im Nährboden mattbraune Farbe ab.

Kartoffelblock: Weisse Kolonie mit starker Sporenbildung bildet am Block bräunlich-lila Farbe.

Auf *synthetischem Nährboden* in Flüssigkeitskultur schwache Entwicklung, Farbe wird nicht synthetisiert.

Gelatine wird kräftig verflüssigt, in den Nährboden wird eine braune Farbe abgegeben.

Auf *Zellulose* schwache Entwicklung, Saccharose wird nicht invertiert, Stärke wird hydrolysiert.

Mikrokultur: Verzweigende Myzelien. Gerade, lange Sporenträger mit runden Sporen, die nach Plasmateilung zustande kommen. Sehr gute Sporenbildung.

Antibiotische Eigenschaft: Erzeugt ein sowohl auf Gram-positive als auch auf Gram-negative Bakterien wirkendes Antibiotikum; hat sich in seiner Antibiotikum-Produktion während anderthalbjähriger Kultivierung im Laboratorium als konstant erwiesen.

Unter den Umwandlungsmethoden haben wir die folgenden benutzt: auf einem durch Schütteln gelüfteten, mit Leitungswasser bereiteten flüssigen Fleischextrakt-Pepton-Glukose-Nährboden (48 p. 68) kultivierten wir die zur Gruppe Streptomyces globisporus gehörende Art (die wir der Einfachheit halber im weiteren mit der Laboratoriumsbezeichnung Xj9 anführen) durchschnittlich 5 Tage lang. Die Myzeliummasse reinigten wir vom Nährboden durch einfaches Filtrieren sowie durch Waschen mit destilliertem Wasser; das Waschwasser liessen wir von der Oberfläche absaugen, wonach wir das Gewicht der noch nassen Myzelien feststellten. Hiernach wurden sie im Porzellanmörser mit Quarzsand verrieben und mit der fünffachen Menge der auf die Myzelienmasse berechneten 1 : 3-Verdünnung des obigen Nährbodens mit Leitungswasser in einen Kolben eingewaschen. Hiernach liessen wir die im Kolben befindliche Suspension 20 Minuten schütteln und filtrierten sie sodann durch Seitzfilter EK. Da die Art Xj9 in diesem verriebenen Zustand durch die Seitz-Filterplatte hindurchdringt und ihre Makrosiedlungen nach 24 Stunden bei Zimmertemperatur sichtbar werden, d. h. eine sehr rasche Regeneration stattfindet, sind wir in der Weise vorgegangen, dass wir nach der ersten Filtrierung das Filtrat bei einer Temperatur von 18° C in den Thermostat stellten und es nach 72 Stunden erneut durch den Seitz-Filter filtrierten. Bekanntlich filtriert die Seitz-Filterplatte EK nur Keime in einer Grösse von mehr als 1 Mikron, woraus festgestellt werden kann, dass sich die infolge der Zerstörung entstandenen Körper in einer Grösse von weniger als 1 Mikron bei unserer umwandelnden Art leicht regenerieren. Das nach der zweiten Filtration gewonnene sterile Filtrat verbrachten wir in Mengen von je 5 ml in sterile Reagensgläser und entnahmen aus diesen Sterilitätsproben, die wir während der ganzen Versuchszeit aufbewahrten und nachkontrollierten.

Experimenteller Teil

Die zur Umwandlung bestimmte, den Streptomyces globosus nahestehende Art (die im weiteren einfach mit T3 bezeichnet wird) impften wir in den oben beschriebenen sterilen flüssigen Nährboden ein, und zwar mit voller Population. Wir suchten demnach nicht von einer Einzellenkultur auszugehen. Nach den Hinweisen von *Kalina* [24] impften wir das Filtrat des Xj9-Zellsaftes mit den Sporen einer sehr alten, d. h. viermonatigen, auf Schrägagar gehaltenen T3-Kultur und inkubierten es im Thermostat bei 28° C. Die Kultur wurde an jedem fünften Tag zusammen mit 1 ml flüssigem Nährboden in den mit dem sterilen Xj9-Zellsaftfiltrat bereiteten Nährboden weitergeimpft. Nach der vierten Überimpfung erhöhten wir die Zellsaftmenge der Xj9-Art im Nährboden auf das Doppelte. Bei der sechsten Passage war es bereits offensichtlich, dass sich die Art wesentlich verändert hatte, und die nach der siebenten Passage vorgenommene morphologische und physiologische Untersuchung der sich verändert zeigenden Art führte zu folgenden Ergebnissen (Nährboden-Angaben siehe bei T_3):

Synthetischer Glyzerin-Agar: Weisser, griesartiger Belag, im Nährboden bildet sich helle, grünlichgelbe Farbe; es besteht demnach auch ein Unter-

schied gegenüber den Arten Xj9 und T3. In der Kolonieform ist mehr Ähnlichkeit mit Xj9.

Bouillon-Agar : Ein wenig grün gefärbte, sich gut entwickelnde Kolonie. Im Nährboden wird mattbraunes Pigment abgegeben ; steht näher zu Xj9.

Asparagin-Agar : Einheitliche, belagartige, winzige gelbliche Kolonien. Unterscheidet sich scharf von T3, ähnelt in der Kolonieform Xj9, weicht aber in der Farbe und Sporenbildungsfähigkeit auch hiervon ab.

Czapek-Agar : Xj9 ähnlicher weisser mehliger Belag.

Rüben-Agar : Grünlichgelber einheitlicher Belag mit schwacher Sporenbildung. Gibt im Nährboden hellgelbe Farbe ab, unterscheidet sich von den Arten Xj9 und T3.

Kartoffel-Block : Gelbe Kolonie mit schwacher Sporenbildung, die sich sowohl von der Xj9- als auch der T3-Kultur scharf unterscheidet.

Synthetischer Nährboden : Synthetisiert keine Farbe in der Flüssigkeitskultur und stimmt darin mit der Art Xj9 überein. Gelatine verflüssigt sie ebenso wie Xj9, im Gegensatz zu T3 ; bildet keine braune Farbe und unterscheidet sich darin von beiden. Stärke wird hydrolysiert.

Zum Vergleich der Makrosiedlungen bringen wir die aus Tafel I ersichtlichen Aufnahmen, welche auf Waksmanschem Fleischextrakt-Pepton-Glukose-Nährboden kultivierte Makrokolonien darstellt. Abb. I[1] zeigt die sehr charakteristische Makrokolonie von Xj9, eine sich in der Mitte scharf hervorhebende und dann von hieraus nach dem Rande zu in zirkulärer Struktur verflachende rundrandige Siedlung, in der kräftige Luftmyzelienbildung von heller Sandfarbe beobachtet werden kann. Ein Charakteristikum ist ferner, dass zwischen den ausgebildeten Makrokolonien morphologische Unterschiede nicht zu finden sind. Auf der Aufnahme Nr. 2 der I. Tafel ist das häufigere Siedlungsbild von T3 zu sehen. Hier handelt es sich um in charakteristischer Weise radial eingekerbte Kolonien mit schwach zackigem Rand. Die Kolonienfarbe ist hier weiss, kann aber ebenso auf diesem Nährboden in anderen Fällen grau bzw. dunkelbraun sein. Aufnahme Nr. 3 zeigt zur Demonstrierung der Variabilität die dunkelbraunen und weissen Kolonien von T3. Aufnahme Nr. 4 stellt den umgewandelten Stamm T3 nach der siebenten Passage dar. Es ist zu erkennen, dass die einzelnen Kolonien — obwohl ihr Ausmass darauf hindeutet, dass sie gleich lange bestehen — Luftmyzelien doch nicht in der selben Weise bilden. Es fällt nämlich auf, dass die Luftmyzelienbildung bei den einzelnen Makrokolonien von den Rändern aus nach innen zu in verschiedenem Ausmass erfolgt. Nach einer gewissen Zeit bilden sich die Luftmyzelien auf der Oberfläche jeder einzelnen Kolonie. Die einzelnen, zu verschiedener Zeit sporenbildenden Kolonien haben wir jede für sich untersucht und festgestellt, dass ihre oben beschriebenen Eigenschaften im wesentlichen identisch sind, lediglich im Grad der Sporenbildung und in der violetten Farbbildung auf dem synthetischen Glyzerin-Nährboden besteht eine geringe Variabilität.

Auf Tafel II zeigen wir das mikroskopische Bild der umzuwandelnden sowie der umwandelnden Art und des umgewandelten Stammes in der mit der Fortner-Agar-Blockmethode bereiteten Kultur. Die Abb. 1/a und 1/b zeigen die Luftmyzelien von T3. Die Bildung der Luftmyzelien kommt in charakteristischer Weise damit in Gang, dass Luftmyzelien herauswachsen, welche nicht dicker sind als die Substratmyzelien ; dies ist aus Abb. 1/b gut ersichtlich. Den nächsten Abschnitt der Entwicklung zeigt der auf Abb. 1/a aus dieser Rosettenform herauswachsende 1 Mikron dicke gerade Sporenträger. Auf der Mikroaufnahme Nr. 2 sehen wir scharf einen geradestehenden Sporenträger mit Sporen der umwandelnden Art Xj9. In der oberen Ecke des Bildes können wir auch zwei herausgefallene alleinstehende runde Sporen beobachten. Der Sporenträger hat einen Durchmesser von 1 Mikron, während die weniger scharf sichtbaren Substratmyzelien einen solchen von 0,5 Mikron aufweisen. Abb. 3 zeigt das Bild der umgewandelten T3 nach der siebenten Passage. Das in der unteren rechten Ecke des Bildes sichtbare Luftmyzelium stimmt mit dem Lutfmyzelium des auf Abb. 2 sichtbaren Xj9 fast überein. Wenn wir jedoch dessen Fortsetzung nach der Mitte des Bildes hin verfolgen, wenn wir weiterhin die beiden anderen gut sichtbaren Luftmyzelien ebenfalls anschauen, können wir feststellen, dass die sich im Luftmyzelium bildenden einzelnen Sporenträger nicht von gleichem Ausmass sind, sondern sich darunter auch solche befinden, welche fast anderthalbmal so gross oder noch grösser sind als die Sporen von Xj9 (durchschnittlich 1,5 Mikron), während wir dazwischen auch ganz kleine Sporen sehen, die ein Mass von 0,5 Mikron aufweisen. Sehr charakteristisch für einzelne Luftmyzelien ist, dass diese bereits keine Rosetten bilden, ja in einzelnen auch Sporen von unregelmässiger Form beobachtet werden können.

Unter den in der physiologischen Funktion eintretenden Veränderungen ist am beachtenswertesten, dass während T3 auf dem synthetischen Nährboden den flüssigen Nährboden in der in der Charakteristik angeführten Weise mit sehr intensiver Farbenbildung färbt, der umgewandelte Stamm die in das Substrat diffundierende Farbenbildung vollkommen verliert, sich aber auch mit der Umwandlung die bräunliche Farbe der Kolonie verändert und das Substratmyzelium stattdessen gelb wird, das Luftmyzelium dagegen weiss, weisser als das Luftmyzelium von Xj9.

Das Ergebnis einer wesentlichen Veränderung in seinem Enzymsystem ist die Tatsache, dass T3 zur Proteolyse unfähig ist, während der umgewandelte Stamm die Fähigkeit zur Proteolyse im gleichen Masse besitzt wie die umwandelnde Xj9.

Die Antibiotikumproduktion ist sowohl für Xj9 als auch für T3 charakteristisch. Xj9 wirkt in gleicher Weise auf Gram-positive und Gram-negative Bakterien, vermag jedoch das Antibiotikum nur in Gegenwart von Eiweiss oder Eiweissderivaten zu produzieren. Für T3 ist charakteristisch, dass es sein nur auf Gram-positive Bakterien wirkendes Antibiotikum auf synthetischem

TABELLE I

Ergebnis einer Fermentation von T3, Xj9 und einer nach 7 Passagen umgestalteten Art

		Auf Waksmanschem Nährboden		Auf synthetischem Ammonium-phosphat-Nährboden	
		Radius der Hemmungszonen in mm auf B. subtilis	E. coli	Radius der Hemmungszonen in mm auf B. subtilis	E. coli
	24 Stunden	3, 2—3	0, 0	4—5, 3—4	0, 0
T_3	48 «	0, 0	0, 0	3,4, 4—5	0, 0
	72 «	0, 0	0, 0	kaum, 5—7	0, 0
	96 «	0, 0	0, 0	0, 3—4	0, 0
	24 «	7, 7	2, 2	0, 0	0, 0
	48 «	7, 7	2, 2—3	kaum, kaum	0, 0
Xj9	72 «	8—6, 6	2,5—4, 3—3,5	kaum, 0	0, 0
	96 «	7, 7,5	2, 3	1—2, 1—2	0, 0
Nach 7	24 Stunden	8—9, 7—8	2, 2	kaum, 0	0, 0
Passagen	48 «	7, 7	2—3, 2—3	0, 0	0, 0
gewonnene	72 «	6—6,5, 6—8	3—4, 2—3,5	0, 0	0, 0
Art	96 «	7—7, 5, 7	3, 2	0, 0	0, 0

Nährboden erzeugt und die Produktion durch Zugabe von Aminosäuren (Glykokoll, Tyrosin, Tryptophan) erhöht werden kann. In der Antibiotikumproduktion des umgewandelten Stammes ist im Vergleich zur Ausgangsart eine wesentliche Veränderung eingetreten. Der wesentlichste Teil der Veränderung besteht darin, dass während es vorher nicht gelungen ist, einen unter Fermentationsverhältnissen auf Gram-negative Bakterien wirkenden Stoff festzustellen, der umgewandelte Stamm auch ein auf Gram-negative wirkendes Antibiotikum synthetisiert, wie dies aus Tabelle I im einzelnen hervorgeht. Dieser Tabelle ist zu entnehmen, dass er auf die beiden Testbakterien, d. h. B. subtilis und E. coli, auf dem Waksmanschen Fleischextrakt-Pepton-Glukose-Nährboden in geschüttelter Kultur fermentiert, eine Wirkung von gleichem Ausmass ausübt wie unter denselben Umständen die umwandelnde Art Xj9 ; doch weicht er auch, wie wir sehen, quantitativ und qualitativ von der Wirkung des Antibiotikums der Ausgangsart T3 ab. Bei der Untersuchung der Ergebnisse der auf synthetischem Nährboden durchgeführten Fermentationen können wir feststellen, dass auch hier eine sehr grosse Abweichung vorliegt, und zwar insofern, als die umgewandelte T3 weder ein auf B. subtilis noch auf E. coli wirkendes Antibiotikum erzeugt ; in ähnlicher Weise verhält sich auch Xj9, jedoch mit dem Unterschied, dass diese am Ende der Fermentation nur auf B. subtilis eine minimale Hemmungszone von 1—2 mm aufweist. Da Xj9 — wie sich gut nachweisen lässt — gut autolysiert, ist zu folgern, dass es dieses am Ende der Fermentation erscheinende minimale Antibiotikum aus dem im autolysierten Myzelium freige-

wordenen Eiweiss bzw. aus den Eiweissderivaten synthetisiert, während die Ausgangsart T3 im Gegensatz zu den vorhergehenden auf synthetischem Nährboden auf B. subtilis Antibiotikum gut produziert, auf E. coli jedoch wirkungslos ist.

Wir untersuchten auch den Antagonismus zwischen der Ausgangsart, der umwandelnden Art und dem umgewandelten Stamm, der in Tabelle II veranschaulicht wird. Die Untersuchung führten wir mit dem Züchtungsfiltrat geschüttelter Kulturen nach der für biologische Wertmessungen allgemein gebräuchlichen Agar-Diffusionsmethode durch. Hier nahmen wir nur zum Vergleich bei der Bewertung an, dass + schwache und + + starke Hemmung bedeutet. Aus der Tabelle ist gut zu entnehmen, dass T3, d. h. die Ausgangsart, die umwandelnde Art, d. h. Xj9, stark hemmt, während die umwandelnde Art Xj9 die T3

TABELLE II

Antagonismus zwischen den untersuchten Arten

	T_3	*Xj9*	T_3 nach der 7. Passage	T_3 nach der 12. Passage
	als Antagonisten verwendet			
Tj_3	0	+	0	++
Xj_9	++	0	0	0
T_3 nach der 7. Passage	++	0	0	0
T_3 nach der 12. Passage	++	0	0	0

++ = Hemmung
+ = schwache Hemmung

nur schwach hemmt. Der umgewandelte (nach 7 Passagen zustande gekommene) Stamm wird von der Ausgangsart, d. h. T3, stark, jedoch von Xj9 nicht gehemmt. Der umgewandelte (nach 7 Passagen zustande gekommene) Stamm hemmt weder die Ausgangs- noch die umwandelnde Art.

Zum Vergleich der antibiotischen Wirkstoffe obiger Arten nahmen wir papierchromatographische Untersuchungen vor. Aus den Züchtungsfiltraten geschüttelter Kulturen applizierten wir mit der Platinöse nach zwischendurch erfolgter Trocknung die gleiche Menge auf Filterpapier. (Das Filterpapier war von nicht näher bekannter Qualität, jedoch für den Zweck geeignet.) Nach Trocknung und Ausgleich mit Lösungsmitteldämpfen führten wir die aufsteigende Chromatographie durch. Als Lösungsmittel benutzten wir mit Wasser gesättigtes n-Butanol + 2%ige Lösung von p-Toluolsulfosäure [37]. Entfernung: 25—30 cm. Die getrockneten Streifen legten wir auf mit B. subtilis infizierte Agarplatten und inkubierten sie bei 37° C 12—16 Stunden. Wir erhielten folgende Ergebnisse: auf dem Chromatogramm von Xj9 sind 3 Hemmungs-

zonen zu sehen, eine unmittelbar über der Stelle des Auftröpfelns (kleiner Rf-Wert, sich langsam bewegendes Antibiotikum), die zweite ist eine sich rascher bewegende Komponente (höherer Rf-Wert) in einem sich lang hinziehenden Fleck, während sich die dritte von der Auftropfstelle noch weiter entfernt befindet. Eine der ersten und zweiten entsprechende Zone ist auch auf dem Chromatogramm des umgewandelten Stammes zu sehen, doch fehlt hier die dritte Komponente. Im Chromatogramm von T3 ist nur eine sehr schwache Hemmungszone sichtbar, welche derjenigen entspricht, die sich bei dem Chromatogramm von Xj9 in der Mitte befindet.

Zur Feststellung des Unterschiedes zwischen der Ausgangsart und den umwandelnden Arten sowie zur Bewertung der entstandenen Stämme führten wir unter Vergleich der Aminosäurenzusammensetzung der Körpereiweisse eine orientierende papierchromatographische Untersuchung durch. Wir stellten fest, dass T3 auch Aminosäuren enthält, über die Xj9 nicht verfügt, und umgekehrt, dass sich auch im Körper von Xj9 Aminosäure-Komponenten befinden, die in T3 fehlen, während bei der umgewandelten Art die Aminosäure-Komponenten beider «Eltern» vorhanden sind.

Weitere Behandlung des umgewandelten Stammes mit dem Zellsaftfiltrat von Xj9

Den nach der siebenten Passage untersuchten Stamm setzten wir weiteren 5 Passagen aus. Diese Versuche nahmen wir mit genau der gleichen Menge Xj9-Zellsaftfiltrat vor, mit welcher wir nach der vierten Passage gearbeitet hatten. Das Verfahren war dasselbe wie vorher, d. h. wir übertrugen die bei 28° C im Thermostat gehaltene Kultur jeden fünften Tag. Bei der Untersuchung des Stammes nach der fünften Passage, d. h. insgesamt nach der zwölften Passage, liess sich feststellen, dass die Umwandlung noch vollkommener geworden war. In den physiologischen Proben stimmte der Stamm mit Xj9 vollkommen überein, wobei er auch die charakteristische violette Farbenbildung des Xj9 auf dem Lindenbeinschen glyzerinhaltigen synthetischen Agar-Nährboden — wenn auch in geringerer Intensität — übernommen hatte. Morphologisch fanden wir einen Unterschied im Grad der Sporenbildung sowie darin, dass die Konsistenz der Sporen beim Hinüberschieben mit der Platinöse sich von Xj9 in feststellbarer Weise wesentlich unterscheidet. Während nämlich die Sporen von Xj9 mit der Platinöse von der Oberfläche des Schrägagars sehr leicht in grosser Menge abgenommen werden können, lassen sich die Sporen im Stamm nach der zwölften Passage schwerer abkratzen und sind von zusammenhaftender Konsistenz. Dieser Unterschied ist auf dem Waksmanschen Fleischextrakt-Pepton-Glukose-Nährboden deutlich wahrnehmbar. Auf demselben Nährboden sind die Luftmyzelien im Stamm nach der 12. Passage schneeweiss, die des Xj9-Stammes dagegen sandfarben.

Das Bild der Makrosiedlungen stimmt mit der auf der Tafel I/1 sichtbaren Aufnahme von Xj9 vollkommen überein, während auf dem Bild der Mikrokolonie (Tafel II/4), obwohl sich darin ebenfalls gerade verlaufende Sporenträger befinden und dieses Bild nicht mehr solche Verzweigungen und Ungleichmässigkeiten zeigt wie der Stamm nach der siebenten Passage, die Sporenträger nicht völlig den Sporenträgern von Xj9 gleichen, weil die einzelnen Sporen im allgemeinen runder und um ein halbes Mikron grösser sind als die des Xj9. Menge und Wirkungsspektrum der Antibiotikum-Produktion stimmen mit denen von Xj9 überein.

Nach dem Gesagten sind wir — gleichfalls in Gegenüberstellung zu Xj9, T3 und zu dem nach den 7 Passagen gewonnenen umgewandelten Stamm — zu den auf Tabelle IV angeführten Ergebnissen gelangt. Aus der Tabelle geht hervor, dass der Stamm nach der 12. Passage vom Stamm nach der 7. Passage in der Hinsicht stark abweicht, dass er die Ausgangsart (T3) hemmt und diese Hemmung kräftiger ist als die Wirkung, welche Xj9 auf T3 ausübt.

Wiederholung der Versuche

Den Versuch haben wir zu verschiedener Zeit unter Einstellung mehrerer Parallelen fünfmal wiederholt. Einer dieser Versuche ergab genau das gleiche Ergebnis wie der erste Versuch. In einem anderen veränderte sich nach der zehnten Passage die Farbe der Siedlung, und jedes Glied der Population bildete gleichmässig weisse Kolonien. In geringem Ausmass wurde auch ein auf Gram-negative Bakterien wirkender antibiotischer Stoff erzeugt. Charakteristisch war ferner, dass in der Umgebung kein dunkelbraunes Pigment diffundierte. Bei den übrigen Wiederholungen konnten die angeführten Veränderungen nur gesondert beobachtet werden.

Unserer Ansicht nach ist zur völligen Umwandlung offenbar einerseits eine Original-Seitz-Filtereinlage erforderlich, anderseits muss der zuerst filtrierte Körpersaft, in dem sich die Art aus den durch den Filter gedrungenen Zellteilen regeneriert und wahrscheinlich den nicht regenerierten Teil des Filtrats in verschiedenem Ausmass abbaut, mindestens drei Tage lang bei Zimmertemperatur (18°C) gehalten werden. Diesem Umstand ist zuzuschreiben, dass die Wiederholungen kein einheitliches Bild aufweisen, weil nach dem Gesagten je nach dem Abbau jeweils eine andere Wirkung eintritt.

Reziproke Versuche

Um festzustellen, in welchem Masse die erworbenen Eigenschaften des nach der siebenten Passage umgewandelten Stammes stabil sind, gingen wir auf zweierlei Weise vor: das eine Verfahren bestand darin, dass wir den nach der

siebenten Passage gewonnenen Stamm ein halbes Jahr hindurch mit häufiger Überimpfung behandelten ; als wir ihn hiernach untersuchten, gelangten wir zu dem Ergebnis, dass seine Sporenbildungsfähigkeit abgenommen hatte, die übrigen morphologischen und physiologischen Eigenschaften jedoch erhalten geblieben waren. Wir nahmen an, dass wir die Stabilität oder Labilität des umgewandelten Stammes am besten dadurch feststellen können, dass wir ihn im Zellsaftfiltrat der Myzelien der Ausgangsart T3, das ähnlich hergestellt wird wie das Zellsaftfiltrat von Xj9, kultivieren, d. h. versuchen, ihn in seinen ursprünglichen Zustand zurückzuverwandeln. Den Versuch führten wir in ganz ähnlicher Weise durch wie die bereits beschriebene Methode, und nach sieben Passagen untersuchten wir den Stamm. Es konnte festgestellt werden, dass er sich in keiner Weise zurückverwandelt hatte, lediglich in der Sporenbildungsfähigkeit sahen wir eine geringe Abnahme.

Es schien notwendig, auch die Art Xj9 mit dem Zellsaftfiltrat von T3 durch fünftägliche Überimpfung der vegetativen Hybridisationswirkung auszusetzen. Auch diesen Versuch führten wir in 7 Passagen durch und stellten sodann nach der morphologischen und physiologischen Untersuchung fest, dass diese Behandlung auf Xj9 ohne jede Wirkung war. Xj9 ist also widerstandsfähiger und konservativer als T3.

Besprechung der Ergebnisse

In unseren Versuchen ist als sehr wesentlich zu betrachten, dass sich die variable Art T3 zu einer Art entwickelt hat, welche auch über die für uns wertvolleren Eigenschaften der umwandelnden Art Xj9 verfügt (gute Sporenbildungsfähigkeit, starke proteolytische Tätigkeit, Erzeugung eines auf Gramnegative Bakterien wirkenden Antibiotikums) und gleichzeitig z. B. die für uns sehr ungünstige starke Farbenbildung verloren hat. Letzteres ist weitergehend auch deshalb von Bedeutung, weil dieses Merkmal eine sehr stabil erscheinende Eigenschaft der Art T3 war.

Durch morphologische und physiologische Untersuchungen konnten wir feststellen, dass der nach der siebenten Passage gewonnene Stamm der umwandelnden Art Xj9 nähersteht als der Ausgangsart T3 ; sein intermediärer Charakter zeigt sich jedoch im folgenden : er enthält Überbleibsel der für T3 kennzeichnenden Rosettenform, und die Grösse der in einem Sporenträger befindlichen Sporen ist völlig heterogen ; sein Züchtungsfiltrat wirkt weder auf Xj9 noch auf T3 hemmend ; nach der papierchromatographischen Untersuchung hat er von Xj9 das eine Antibiotikum übernommen, das andere jedoch nicht ; die in T3 und in Xj9 anwesenden Aminosäuren sind auch im umgestalteten Stamm gemeinsam vorhanden, obwohl in der Aminosäurenzusammensetzung von T3 und Xj9 sonst Abweichungen bestehen.

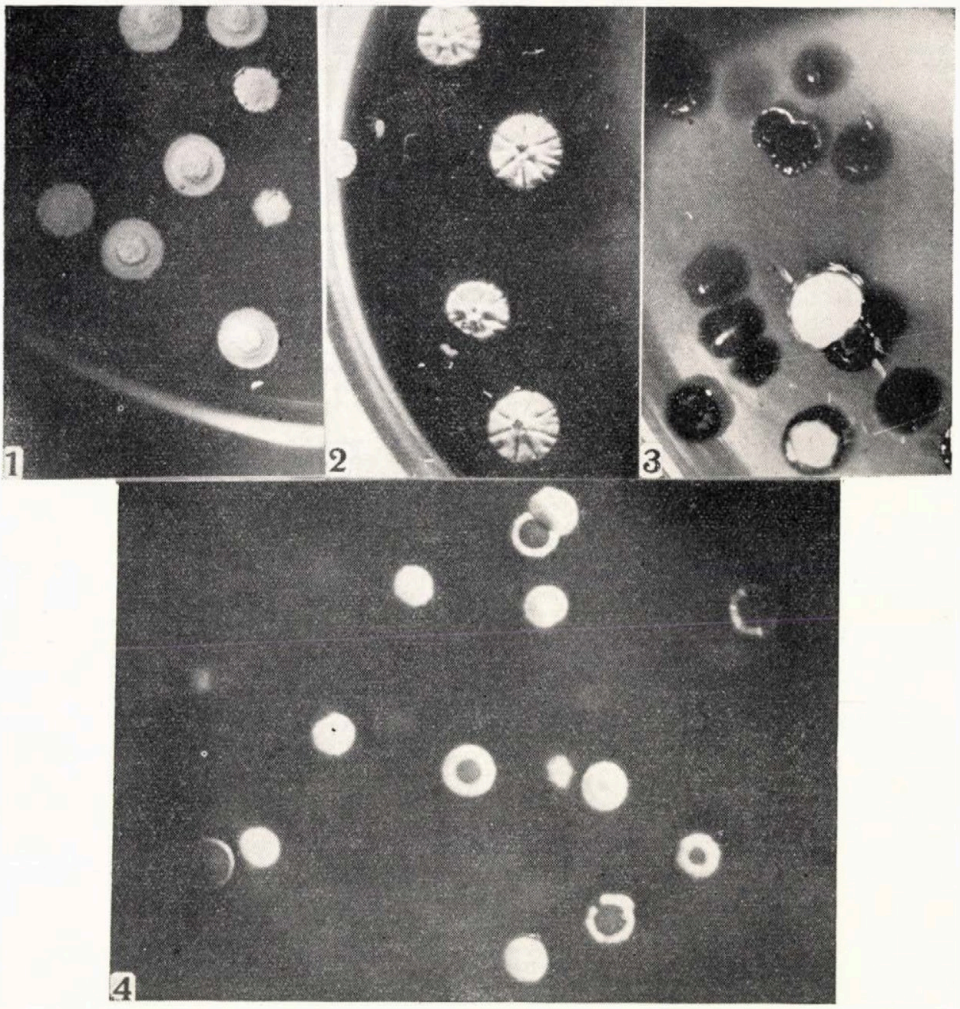
Der intermediäre Charakter in dieser gut abgrenzbaren Weise hört jedoch dann auf, wenn wir den Stamm der transformierenden Wirkung weiterer Passagen aussetzen. In diesem Fall nähert sich der sich umwandelnde Stamm fast ganz der umgestaltenden Art. In seinen Eigenschaften nimmt er einen Charakter an, als ob er eine Variante von Xj9 wäre, wenn auch z. B. seine Aminosäurenzusammensetzung weiterhin gemischt verbleibt. Ähnlichen Ergebnissen begegnen wir auch bei Versuchen mit Parastämmen [24].

Es bedeutet für uns ein wesentliches Ergebnis, dass sich die Hybridisationsmethode dazu eignet, intermediäre Formen zustande zu bringen ; so stellt gerade die Übergabe der antibiotischen Eigenschaft in unserem Versuch ein Resultat dar, das uns weitere Möglichkeiten garantiert. Die Tatsache, dass Xj9 eines seiner Antibiotika dem umgewandelten Intermediärstamm übergab, ermöglicht auch seine Verwendung in der Praxis, da die Gewinnung eines einzelnen Antibiotikums bei den Antibiotika erzeugenden Stämmen ein sehr wichtiges Problem darstellt.

Es ergibt sich die Frage, ob die intermediäre Form als selbständige Art betrachtet werden kann. Vergleichen wir sie mit dem morphologischen und physiologischen Charakter der Ausgangsart und der umgestaltenden Art, so müssen wir festsellen, dass sie sich von beiden entschieden absondert.

Krassilnikow, *Korenjako*, *Nikitina* und *Skriabin* [3] unterschieden drei Gruppen von Streptomyces (Actinomyces) albus (Gruppe A, B, V) auf Grund des Prinzips, dass diese einander gegenseitig hemmen und das Glied der einen Gruppe zur Erzeugung des Antibiotikums eiweissreichen Nährboden, die andere dagegen eiweissarmen Nährboden beansprucht ; aber auch hinsichtlich der Kohlenquelle bestehen jeweils andere Ansprüche bei der Produktion des Antibiotikums. Von diesem Gesichtspunkt aus lassen sich die in unserem Versuch vorkommenden Arten T3 und Xj9 gut voneinander abgrenzen. Unser nach der siebenten Passage gewonnener Stamm ist auch auf Grund dieses Prinzips von T3 gut zu unterscheiden, von Xj9 jedoch nicht (Tabelle II). Trotzdem lässt er sich nicht mit Xj9 als identisch qualifizieren, da sehr grosse morphologische und physiologische Differenzen bestehen. Wenn auch das Antibitiokum unserer nach der siebenten Passage gewonnenen Art einem der Antibiotika der Xj9-Art entspricht, kennen wir doch auch solche von Streptomyces erzeugte Antibiotika (z. B. das Actinomycin), welche von verschiedenen, voneinander gut abzugrenzenden Arten synthetisiert werden [26, 46, 47, 49]. Wir glauben daher, dass wir die intermediäre Form als eine gut abgetrennte Art auffassen können. Auch die Vererblichkeit der erworbenen Eigenschaften dieser Art ist als Beweis für die Selbständigkeit der Art zu betrachten.

Wir halten es für ein bedeutsames Ergebnis, dass während sich nach der Mutationslehre selbst auf die Wirkung der mutagenen Agenzien ein Teil der behandelten Zellen nur zu einem ganz minimalen Promille verändert, demgegenüber bei unserem Versuch in wesentlichem Widerspruch zum Morganismus die



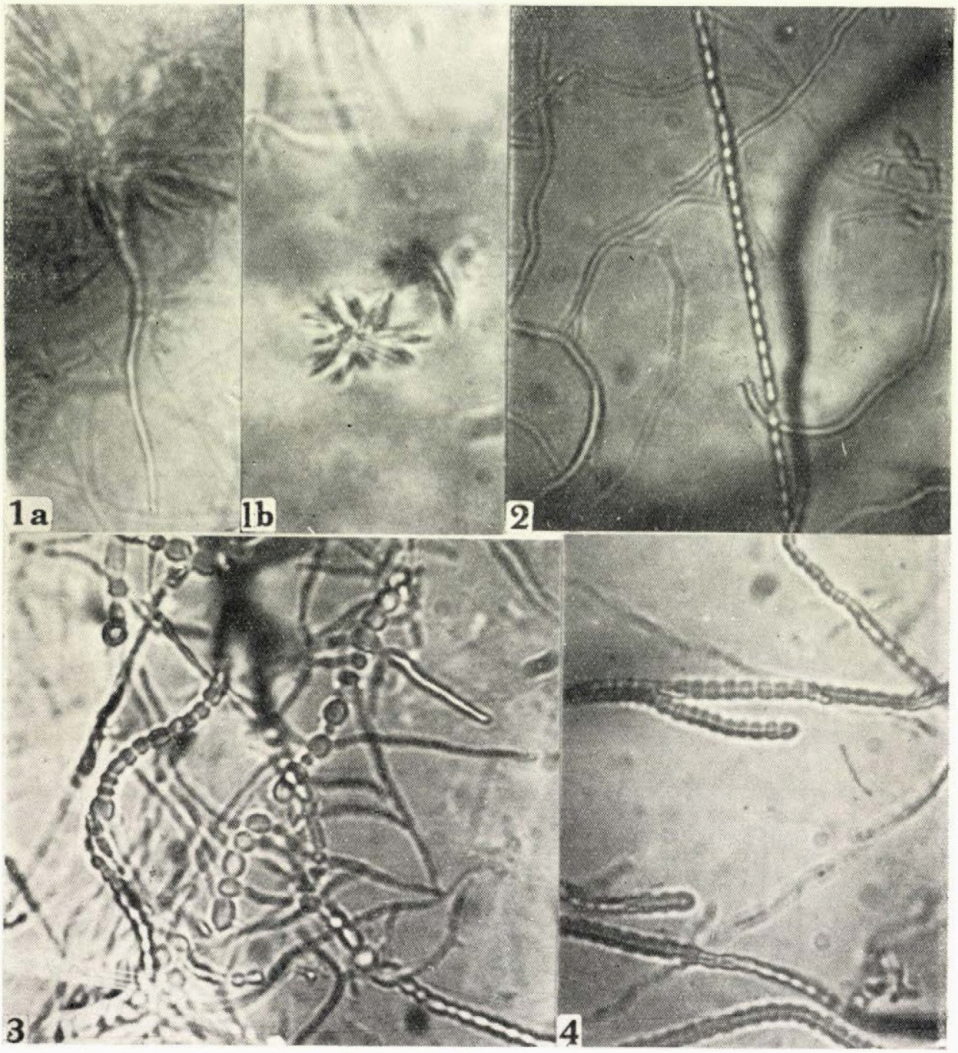
Tafel I

1. Makrokolonie von Xj9 auf *Waksman*schem Fleischextrakt-Pepton-Dextrose-Agar. Grösse: um 1/4 grösser als das Original

2. Makrokolonie von T3. Nährboden wie unter 1. Grösse: das Zweifache des Originals

3. Makrokolonien von T3 mit weissen und schwarzen Varianten. Grösse: das Zweifache des Originals

4. Die umgestaltete T3-Art nach der 7. Passage. Grösse: um 1/3 grösser als das Original



Tafel II

1/*a*. Lufthyphe von T3, aus den rosettenförmigen Myzelien herauswachsend. Aufnahme vom Fortner-Agarblock im lebenden Zustand, 2000fache Vergrösserung.

1/*b*. Rosettenförmige Hyphenansammlungen von T3. Mikroaufnahme (Daten wie bei 1/*a*.).

2. Xj9-Sporenträger mit Sporen und Substrat-Myzelien. Sonst wie 1/*a*.

3. Umgestaltete Sporenträger von T3 nach der 7. Passage. Sonst wie 1/*a*

4. Umgestaltete Sporenträger von T3 nach der 12. Passage. Sonst wie 1/*a*

Veränderung der ganzen Population eintrat. Selbst *Kalina* schrieb im Zusammenhang mit den Parastämmen, dass diese rechtzeitig isoliert werden müssen, da die nicht umgewandelten Stämme — als Antagonisten der umgewandelten — jene töten, d. h. also dass die Umgestaltung auch bei den Parastämmen nicht in der ganzen Population erfolgte [23]. Wie wir sehen, besteht dieser Antagonismus auch in unserem Fall (T3 hemmt stark die umgewandelten Arten, s. Tabelle II). Wenn demnach die Umwandlung nicht mit der ganzen Population erfolgt wäre, hätten wir einen Erfolg gegebenenfalls nur durch Selektion erreichen können. Wie jedoch bereits erwähnt wurde, haben wir keine Selektion angewandt.

Schliesslich müssen wir feststellen, dass es nicht möglich war, durch die angewandte Methode der vegetativen Hybridisation T3 aufzubessern (was wir uns als Ziel gesetzt hatten), sondern dass statt dessen eine neue Art zustande kam.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Mit dem steril filtrierten Saft der mit Quarzsand verriebenen Myzelien einer in ihrer Vererblichkeit stark konservativen Streptomyces-Art wurde auf eine in der Vererblichkeit labile Art eingewirkt. Beide Arten sind fähig, ein Antibiotikum zu synthetisieren.

2. Nach siebenmaliger Weiterimpfung hat sich die Art sowohl morphologisch als auch physiologisch verändert.

a) Morphologisch: die Form der Makrokolonie veränderte sich aus einer strahlenförmig segmentierten eine glatte Oberfläche und aus braun in weiss; die Form der Mikrokolonie weist auch innerhalb eines einzigen Luftmyzeliums die Mischung der Ausgangsart und der umgewandelten Art auf.

b) Physiologisch: am wesentlichsten sind der Ausbau des proteolytischen Enzymsystems, die Fähigkeit zur Synthetisierung eines neuen Antibiotikums, welches mit einem der antibiotischen Wirkstoffe der umgestaltenden Art übereinstimmt, der Verlust der diffundierenden Farbenbildung im Nährboden.

c) Die umgestaltete Art hat während halbjähriger Kultivierung die erworbenen Eigenschaften bewahrt.

d) Die umgewandelte Art hat ihren Charakter auch gegenüber Rückgestaltungsversuchen behalten.

3. Nach 12 Passagen nähert sich der umgestaltete Stamm ganz dem morphologischen und physiologischen Charakter der umgestaltenden Art.

4. Die Umgestaltung trat in der ganzen Population ein.

5. Auf Grund von reziproken Hybridisationsversuchen ist festzustellen, dass sich die unter Punkt 1 charakterisierte Methode zur Umgestaltung einer in ihrer Vererblichkeit konservativen Art nicht eignet.

LITERATUR

1. *Alloway, I. L.:* J. Exp. Med., **55,** 91 (1932).
2. *Alloway, I. L.:* J. Exp. Med., **57,** 265 (1953).
3. *Austrain, R.:* Bacteriol. Rev., **16,** 31 (1952).
4. *Avery, O. T., McLeod, C. M.,* und *McCarthy, M.:* J. Exp. Med., **79,** 137 (1944).
5. *Baerthlein, K.:* Münch. Med. Wschr., **44,** 1564 (1916).
6. *Balassa, R.:* MTA VIII. Oszt. Közl., **2,** 309 (1953).
7. *Bergey:* Manual of Determinative Bacteriology, 6th Ed., London, Baillière, Tindall & Cox, 1948.
8. Cold Spring Harbour Symp., **12,** 7 (1947).
9. *Boivin, A.:* Zbl. Bakteriol. I. Orig. **155,** 58 (1950).
10. *Catcheside, D. G.:* The genetics of microorganismus. London, 1951.

11. *Dawson, M. H.* und *Sia, R.:* J. Exp. Med., **54,** 681 (1931).
12. *Ephrussi-Taylor, H.:* Cold Spring Harb. Symp., **16,** 445 (1951).
13. *Феникшева, Р. В.:* Микробиология, **20,** 556 (1951).
14. *Гамалея, Н. Ф.:* Агробиология, **3,** 115 (1946).
15. *Goodall, R. R.* und *Levi, A. A.:* Nature, **158,** 675 (1946).
16. *Грачева, П. Н.:* Агробиология, **3,** 136 (1946).
17. *Griffith, F.:* J. of Hyg., **27,** 113 (1928).
18. *Havas, A.* und *Kubinyi, J.:* A Népegészségügy, 4, 1, (1951).
19. *Horváth, J.* und *Oroszlán, I.:* Agrokémia és Talajtan, im Druck.
20. *Horváth, J., Szolnoki, J.* und *Felföldy, L.:* Acta Biol. Hung., **4,** 453 (1953).
21. *Яковлев, В. И.:* Сб. трудов конф. по сыпн. тифу., Петроград, стр. 9, (1920).
22. *Ерусалимский, Н. Д.:* Успехи соврем. биол., **33,** 148 (1952).
23. *Калина, П. Г.:* Вегетативная гибридизация и направления изменчивости бактерии. Киев. 1952.
24. *Калина П. Г.:* Из. Акад. Наук СССР, стр. **82,** 1952, b.
25. *Kaplan, R. W.:* Annual Rev. Microbiol., **5,** 91 (1952).
26. *Kocholaty, W., Junowicz—Kocholaty, R.* und *Kelner, A.:* Arch. Biochem., **17,** 191 (1948).
27. *Косиков: К. В.:* Доклады Акад. Наук СССР, **73,** 301, (1950).
28. *Krassilnjikow, N. A.:* Bacterium és Actinomyces határozó, 1951.
29. *Красильников, Н. А., Кореняко, А. И., Никитина, Н. И., и Скрябин, Г. К:* Доклады Акад. Наук СССР **77,** 725, (1951).
30. *Kuhn, Ph.,* und *Woite, K.:* Zbl. Bakt. I. Ref., **44,** 123 (1909).
31. *Lindenbein, W.:* Arch. Mikrobiol. **17,** 361 (1952).
32. *Levkovics, E. N.:* Ztschr. Mikr. u. Immun., **8,** 347 (1951).
33. *Manninger, R.* und *Nógrádi, A.:* Experientia, **4,** 276 (1948).
34. *McCarthy, M., Taylor, H. Ex., Avery, O. T.:* Cold Spring Harb. Symp., **11,** 257 (1946).
35. *Oda, Sh.:* Zbl. Bakter. L. Ref., **71,** 536 (1921).
36. *Peterson, D. H.* und *Reineke, L. M.:* J. Amer. Chem. Soc., 72, 3598 (1950).
37. *Savage, M., Florey, H. W.:* Brit. J. Exp. Path., **31,** 17 (1950).
38. *Schmitz, K.:* Zbl. Bakter. I. Orig., **83,** 1, 108 und 210 (1919).
39. *Зильбер, Л. А.:* Съезд бакт. и эпид. 1922.
40. *Silber, L. A.:* Zbl. Bakter. I. Orig., **89,** 250 (1953).
41. *Silber, L. A.:* Zbl. Bakter. I. Orig., **91,** 191 (1924).
42. *Зильбер, Л. А:* Ж. Эксп. биол. и мед., **5,** 122 (1926).
43. *Стресинский, М. О.:* Доклады Акад. Наук СССР. **5,** 131, (1950).
44. *Тимаков, В. Д.:* Известия Акад. Наук СССР. **2,** 36, (1952).
45. *Trussel, P. C.,* und *Richardson, E. M.:* Can. J. Res., 25 (1948).
46. *Waksman, S. A., Geiger, W. B.* und *Reynolds, D. M.:* Proc. Nat. Acad. Sci., **32,** 117 (1946).
47. *Waksman, S. A.:* Microbial Antagonisms and Antibiotic substances. New York, 1947.
48. *Welsch, M.:* Bull. Soc. Chim. biol., **28,** 557 (1946).
49. *Заболитний, Д.К.:* Бакт. и эпид., 1922.

ВЕГЕТАТИВНЫЕ ГИБРИДИЗАЦИОННЫЕ ЭКСПЕРИМЕНТЫ НА ВИДАХ STREPTOMYCES

Я. Хорват, М. Мартон и *И. Орослан*

Резюме

Стерильным фильтратом, полученным путем растирания кварцевым песком мицелия одного консервативного в отношении наследственной способности вида Streptomyces (близкого к виду Streptomyces globosus Красильников), авторы воздействовали на другой вид, принадлежащий к группе Streptomyces globisporus. Сущность действия состояла в том, что преобразуемый вид существовал на фильтрате преобразующего вида. Оба вида являются типичными производителями антибиотиков. Преобразующий вид образует антибиотики, действующие как на грамположительные, так и на грамотрицательные бактерии, а преобразуемый вид оказывает действие только на грамположительные. Каждые 5 дней делались пересевы преобразуемого вида на среду из стерильного фильтрата мицелия, вследствие чего преобразуемый вид (в дальнейшем T_3) в различной степени изменился. В результате одних опытов изменился только цвет колонии и в малой степени

спектр действия. В процессе других опытов наблюдались резкие изменения и T_3 присвоил многие морфологические и физиологические свойства действующего вида. Результаты этого второго опыта выявлялись в нижеследующем :

а) морфологически : поверхность макроколонии стала гладкой и цвет ее изменился из коричневого в белый. В форме макроколонии выявляется смешанность исходного и преобразующего видов даже в каждом воздушном мицелии.

б) физиологически наиболее значительны : развитие системы протеолитического энзима, синтетизирующая способность нового антибиотика, сходная с одним из антибиотических агентов преобразующего вида ; потерей способности образования диффундирующих в питательной среде красок.

в) преобразованный вид сохранил приобретенные в течение полугодового культивирования свойства.

г) преобразованный вид сохранил свою характерность также и при воздействии опытов обратной трансформации.

WIRKUNG VON SCHWERMETALLEN AUF ATMUNG UND REDOXPOTENTIAL VON STREPTOMYCES GRISEUS-KULTUREN

Von
A. KRÁMLI, E. F. PETTKÓ und P. KISS
Medizinisch-Chemisches Institut der Universität Szeged

(Eingegangen am 14. November 1953)

Es ist bekannt, dass Wachstum und Streptomycinproduktion von Streptomyces griseus-Kulturen ausser mit dem optimalen Nährboden auch mit der Sauerstoffversorgung eng zusammenhängen [1]. *Haley* und Mitarbeiter [2] haben auch untersucht, welche Spurenelemente für die Lebenserhaltung und das Wachstum der Zellen erforderlich sind. *Rake* und *Donovick* [3] stellten bei Untersuchung der Nährbodenansprüche des Streptomyces griseus-Stammes fest, dass in Ermangelung entsprechender Metalle die gute Streptomycinproduktion ausbleibt. *Anderson* und *Thornberry* [4] haben auf die wichtige Rolle der Magnesium-, Zink-, Eisen- und Kaliumionen bei der Streptomycinherstellung hingewiesen und festgestellt, dass diese Stoffe zwar für das Wachstum der Zellen nicht unbedingt notwendig sind, dass sie aber die Streptomycinproduktion stimulieren. Sie wiesen ferner nach, dass Calcium weder für das Wachstum noch für die Produktion benötigt wird. Nach den Versuchen von *Chester* und *Robindson* [5] stellen Zink und Kupfer essentielle Stoffe für Wachstum und Produktion dar; das gleiche gilt auch vom Eisen, von dem aber das Fünffache der beiden ersteren benötigt wird.

Nach neueren Untersuchungen [6] ist das Einsetzen der Streptomycinproduktion ein Prozess, der an einen gut definierten Redoxzustand der Kultur gebunden ist, während andererseits der Metabolismus der Zelle mit dem an sie gekoppelten Redoxsystem beeinflussbar ist [7].

Die bei der Streptomycinproduktion in Eisen- und säurefesten Stahlfermentoren beobachteten Schwankungen lassen ebenfalls darauf schliessen, dass auch die aus der Fermentoreinrichtung herausgelösten, wenn auch nur in Spuren vorkommenden Stoffe, als das Redoxpotential (RP) der Kultur beeinflussende Faktoren, auch die Atmung der Zelle und die Streptomycinproduktion beeinflussen.

Ziel unserer Untersuchungen war daher, festzustellen, wie die Atmung von Streptomyces griseus-Kulturen infolge Beeinflussung des Redoxpotentials durch die aus den Eisenfermentoren herausgelösten Schwermetalle verändert wird, und die dabei gemachten Erfahrungen bei der Streptomycinproduktion zu verwerten.

Da unsere früheren Versuche gezeigt hatten, dass die RP-Veränderungen, die auf Wirkung der in die Kulturen hineingelangten Metalle zustande kommen, nach einer gewissen Zeit von den Zellen kompensiert werden, schien es uns angebracht, die RP-Messungen auch auf die Ermittlung des Bedarfes der Kulturen an Spurenelementen auszudehnen. Benutzt wurden hierzu Spurenelemente nicht enthaltende Nährböden und solche, wie sie in Betrieben bei der Streptomycinproduktion Verwendung finden.

Versuchsmethoden

Die Versuche wurden an einer Variante des uns vom Budapester Zentralen Biochemischen Forschungslaboratorium zur Verfügung gestellten Streptomyces griseus-Stammes (Nr. 134) durchgeführt.

Es wurden teils spurenelementfrei gemachte und teils Betriebs-Nährböden verwendet. Für beide Versuchsreihen wurden Vorkulturen hergestellt. Der Nährboden, in dem Vorkulturen für die in spurenelementfreien Nährböden durchzuführenden Untersuchungen angesetzt wurden, hatte folgende Zusammensetzung [8]:

(Nährboden Nr. 1)

Glucose	36,0 g	Na_2HPO_4	2,86 g
Na-lactat	11,2 g	$MnSO_4$	0,087 g
NH_4Cl	4,28 g	$ZnSO_4$	0,017 g
KCl	4,48 g	in 1000 ml destilliertem Wasser gelöst, pH 6,4—7,0.	

Die Zusammensetzung des Betriebs-Nährbodens war folgende:

(Nährboden Nr. 2)

Glucose	47,3 g	$NaNO_3$	5,3 g
Gelatine	8,6 g	KCl	0,5 g
Pepton	4,3 g	KH_2PO_4	1,0 g
Na-acetat	2,1 g	$MgSO_4$	5,3 g
Na-citrat	2,1 g	$MnSO_4$	0,043 g

in 1000 ml destilliertem Wasser gelöst, pH 6,5.

Zusammensetzung des spurenelementfreien Nährbodens [9]:

(Nährboden Nr. 3)

Glucose	36,0 g	Na-lactat	11,2 g
$NaH_2PO_4 \cdot 7\ H_2O$	2,86 g	KCl	4,47 g
NH_4Cl	4,28 g	in 1000 ml destilliertem Wasser gelöst, pH 6,4—7,0.	

Da dieser synthetische Nährboden keine Proteine enthält, ist er leicht von Spurenelementen zu befreien und deshalb gut für die Untersuchung der Wirkung von eingeführten Spurenelementen geeignet. Die Eliminierung der Spurenelemente geschah nach dem von *Donald* und Mitarbeitern [10] empfohlenen, nachfolgend beschriebenen Aluminiumoxyd-Verfahren:

Durch den Nährboden wrd 30 Minuten lang bei pH 7 Schwefelwasserstoff geleitet und die entstehende braune Lösung pro Liter mit 5 g Brockmannschem Aluminiumoxyd versetzt und geschüttelt, 20 Minuten lang bei 0,7 ATÜ im Autoklav gehalten und nach eintägigem Stehen zentrifugiert. Um eine möglichst vollkommene Entfernung der Spurenelemente zu erreichen, wurden die Zentrifugierung und auch alle übrigen Operationen in mit Chromschwefelsäure und nachher dreimal mit destilliertem Wasser gewaschenen Glasgeräten vorgenommen.

Die Vorkulturen stellten wir folgendermassen her: Von den weiter oben angeführten Nährböden wurden nach ihrer Sterilisation je 150 ml in 1000 ml fassende Erlenmeyerkolben gegeben und der Inhalt eines jeden dieser Kolben mit einer Sporensuspension infiziert, die durch Abwaschen je einer auf Schrägagar gezüchteten Kultur mit physiologischer Kochsalzlösung erhalten wurde. Die Kulturen wurden dann während der ganzen Versuchszeit (6 Tage) an Pendel-

Schüttelapparaten befestigt und geschüttelt. Bei den Atmungsversuchen wurden von den in Betriebsnährböden hergestellten Kulturen 1 : 15 verdünnte Suspensionen bereitet und davon je 3 ml in Warburggefässe eingetragen.

Die spurenelementfreien Kulturen für die Atmungs- und RP-Versuche stellten wir folgendermassen her: Die auf dem synthetischen Nährboden gewachsenen Mycelien wurden zunächst mit spurenelementfreiem Puffer mehrmals gewaschen, dann in spurenelementfreien Nährboden aufgenommen und beim Eintragen in die Warburggefässe die bei den Betriebsnährbodenkulturen angegebenen Verhältnisse eingehalten.

Nach Einführung der Schwermetallionen wurde das Volum der Kulturen in beiden Versuchsreihen auf je 4 ml mit Phosphatpuffer ergänzt. Die Salze der als Spurenelemente benützten Metalle waren *Merck*sche Analysenpräparate. Die Atmung der Kulturen wurde im Warburg-Apparat drei Stunden lang bei 30—30,3°C beobachtet.

Die RP-Messung geschah mit Hilfe eines Metrohm-Titriskopes, wobei einer Normal-Kalomelelektrode gegenüber eine glatte Platinelektrode geschaltet war. Die Versuchsbedingungen wurden möglichst genau so gewählt wie in den vorhergehenden Atmungsversuchen. Die RP-Messungen wurden deshalb bei offenen Gefässen vorgenommen und zwecks guter Sauerstoffversorgung die Kulturen mit einem magnetischen Rührer gerührt; die weiter unten angegebenen Messungsergebnisse beziehen sich auf Normalwasserstoffelektrode.

Versuche und Versuchsergebnisse

1. Zusammenhang zwischen Atmung und RP-Veränderung bei Streptomyces griseus-Kulturen

An den in Nährboden Nr. 1 hergestellten Kulturen wurde der Zusammenhang zwischen Atmung und RP-Veränderung folgendermassen untersucht:

Die die Kulturen enthaltenden Kolben wurden mit papierwatteumwickelten Aluminiumstopfen verschlossen und in deren Bohrungen die Platinelektrode, das zur Verbindung mit der Kalomelelektrode dienende KCl-Rohr sowie das Lüftungsrohr und die Vorrichtung zur Probenentnahme befestigt. Die Lüftung der Kulturen besorgte eine elektrische Membranpumpe. Während der sechstägigen Versuchsdauer waren die Kolben an einer Pendelschüttelmaschine befestigt. Aus den so ständig geschüttelten Kulturen wurden täglich Proben für die Atmungsversuche entnommen und ausserdem das Redoxpotential bestimmt.

Es zeigte sich (Abb. 1), dass Erhöhung der Atmung von einer Herabsetzung des RP begleitet ist und umgekehrt das RP ansteigt, wenn die Atmung nachlässt (d. h. wenn die Myzelien altern). So ist die Redoxpotentialkurve eigentlich ein Spiegelbild der Atmungskurve, mit anderen Worten, die RP-Veränderungen zeigen die Atmung der Kultur (das Wachstum der Myzelien) an.

Die Wiederholung der obigen Versuche in spurenelementfrei gemachten Nährböden (Nr. 3) ergab, dass die Kulturen in diesen überhaupt kein Wachstum zeigen. Das RP bleibt hier stets auf der gleichen Höhe, und die für das Wachstum der Kultur charakteristische RP-Senkung sowie die darauffolgende Erhöhung bleiben aus (Abb. 2).

Es kann demnach auf Grund von RP-Bestimmungen festgestellt werden, welche Spurenelmente für das Gedeihen einer Kultur unerlässlich sind.

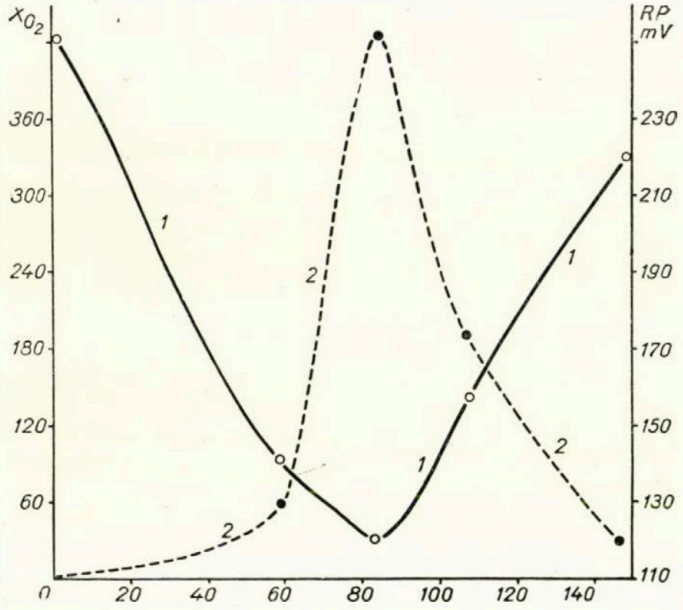


Abb. 1. Zusammenhang zwischen Atmung und Redoxpotential von Streptomyces griseus-Schüttelkulturen in synthetischem Nährboden. 1. Veränderung der Atmung. 2. Veränderun des RP, in Stunden

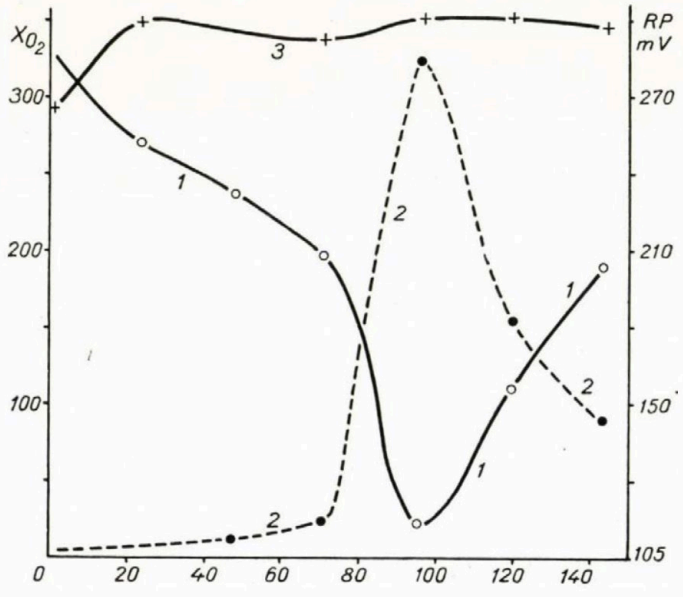


Abb. 2. Veränderung der Atmung und des RP von Streptomyces griseus-Kulturen nach Zugabe von Mangan; 1 stellt die Atmungs- und 2 die RP-Kurve der Kultur in dem spurenelementfrei gemachten synthetischen Nährboden in Gegenwart von Mangan dar; 3 ist die RP-Kurve der in mangan- und spurenelementfreien Nährboden eingetragenen Kultur (gemessen in Stunden)

2. Veränderung der Atmung und des Redoxpotentials der in spurenelementfreien Nährböden gezüchteten Kulturen auf die Wirkung verschiedener Schwermetallionen

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Wirkung von Eisen-, Mangan-, Zink-, Vanadium- und Vanadationen auf die Atmung und das Redoxpotential von Streptomyces griseus-Kulturen untersucht. Hierbei wurden Myzeliensuspensionen aus dem Spurenelemente nicht enthaltenden Nährboden (Nr. 3) mit den in spurenelementfreiem Wasser hergestellten Lösungen der untersuchten Ionen in zunehmender Konzentration versetzt und dann die Atmung und das RP gemessen. Nach den Respirationsversuchen setzt auf die Wirkung von 10γ /ml Mangan das Wachstum der Myzelien ein, und gleichzeitig ergeben sich ähnliche RP-Werte wie bei den in Nährboden Nr. 1 gezüchteten Kulturen (Abb. 2).

Werden dem spurenelementfreien Nährboden 1, 10 oder 30 γ/ml Mangan bzw. je 1 oder 10 γ/ml Mangan und Eisen beigefügt, so tritt ebenfalls eine Atmungssteigerung ein und die RP-Kurve verläuft ähnlich wie in Abb. 1 und 2. Bei der Verabreichung von Zink, das bekanntlich eine Steigerung der Streptomycinproduktion bewirkt, bzw. bei der gemeinsamen Verabreichung von Eisen und Zink bleibt das Myzelienwachstum aus, was in der RP-Kurve ebenso zum Ausdruck kommt wie in Abb. 1 und 2. Dies bedeutet, dass das Mangan ein für das Wachstum der Myzelien essentieller Stoff ist.

In spurenelementfreien Nährböden wurde die Wirkung der verschiedenen Ionen auf die Atmung der Kulturen gesondert untersucht und gefunden, dass Mangan und Zink die Atmung nicht nachweisbar beeinflussen. Vanadationen hatten eine geringgradige Atmungssteigerung (um 20%) zur Folge, während Eisen einen beträchtlichen Anstieg bewirkte. Den stärksten Effekt zeigten Vanadationenen : in einer Konzentration von 100 γ/ml hatten sie die Atmung in der dritten Stunde auf das Dreifache der Kontrollen gesteigert (Abb. 3).

Die Produktionsuntersuchungen ergaben aber, dass Vanadium neben seiner wachstumsfördernden Wirkung die Streptomycinproduktion stark hemmt.

Wir suchten weiter festzustellen, welche Metalle eine ständige Veränderung des Redoxpotentials verursachen und in welcher Konzentration sie ihre Wirkung entfalten. Die in Abb. 4 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass Vanadiumionen eine RP-Erhöhung um 130—140, Zinkionen um 40—50, Vanadationen um 20—25 und Manganionen um 30—40 mV bewirkten.

Die Effekte der obigen Ionen machen sich bereits in geringen Konzentrationen bemerkbar. Ist aber eine bestimmte Konzentration erreicht, so wird die vorübergehende Wirkung neu eingetragener Dosen auf das Redoxpotential von der Kultur kompensiert. Die Erklärung hierfür ist, dass die Redoxkapazität der angeführten Ionen im Verhältnis zu der der Kulturen, die die RP-verändernden Faktoren andauernd produzieren, ziemlich gering ist. Bei höheren Konzentrationen muss ausser der Redoxkapazität auch die Ausfällung der

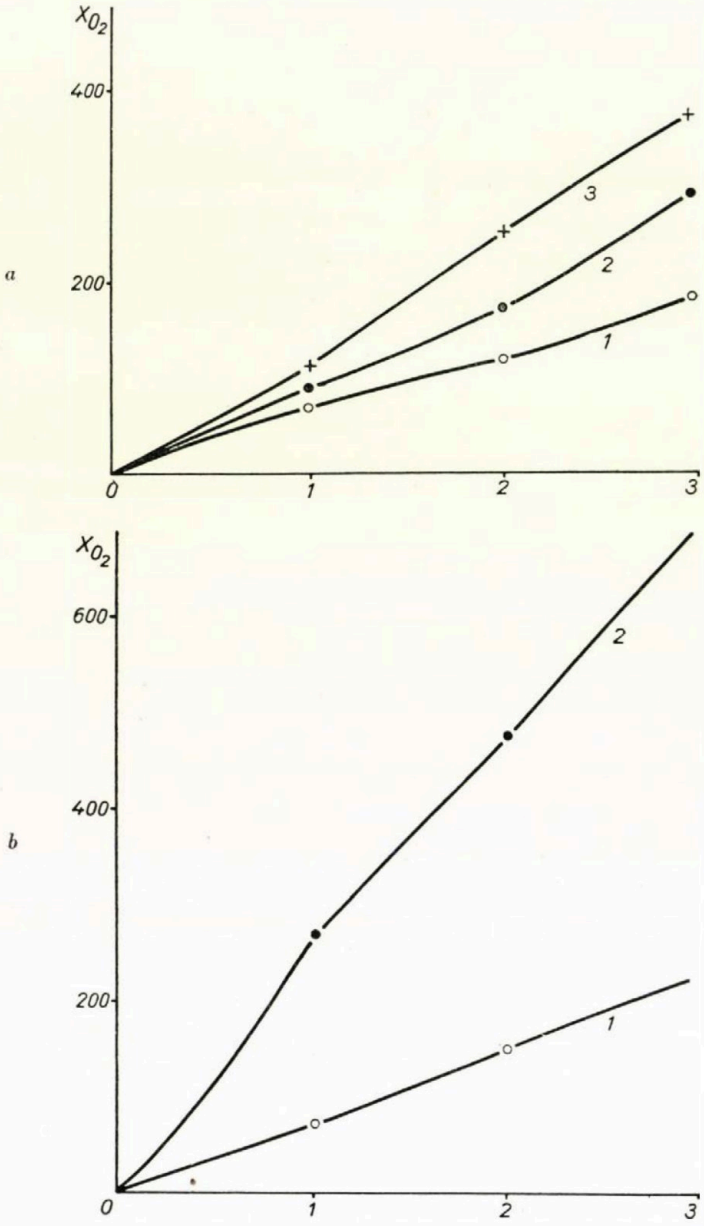


Abb. 3. Wirkung von Eisen und Vanadium auf die Atmung gewaschener Myzeliumsuspensionen der Streptomyces griseus-Kultur in spurenelementfreiem synthetischem Nährboden. (gemessen in Stunden)

a) *Kultur + Eisen* Kurve 1: Kultur ohne Eisen
« 2: « + 20 γ/ml Fe+++
« 3: « + 60 γ/ml Fe+++

b) *Kultur + Vanadium* Kurve 1: Kultur ohne Vanadium
« 2: « + 100 γ/ml V+++

Metalle berücksichtigt werden. So setzt z. B. im Falle des Eisens — wie unsere nephelometrischen Untersuchungen ergaben — in dem von uns benutzten Nähr-

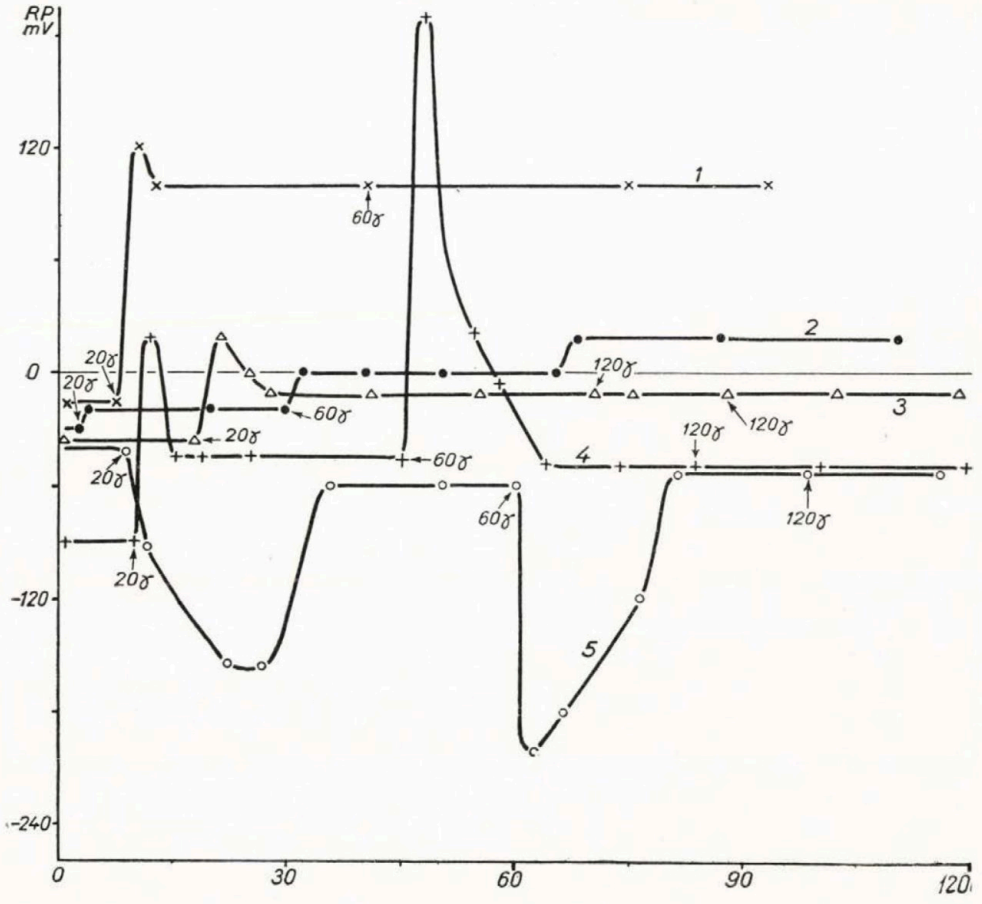


Abb. 4. RP-Veränderung der Streptomyces griseus-Kultur auf Wirkung von Spurenelementen. (gemessen in Minuten)

Kurve 1: RP-Veränderung nach Zugabe von Vanadium
« 2: « « « « Zink
« 3: « « « « Vanadat
« 4: « « « « Mangan
« 5: « « « « Eisen

Die Bestimmungen wurden an mit spurenelementfreiem Puffer gewaschenen Myzelien in spurenelementfreiem synthetischem Nährboden ausgeführt

boden bei Konzentrationen von 40—60 γ/ml Eisenhydroxydausfällung ein, wodurch die Angaben von *Asai* und Mitarbeitern [11], dass Eisen das Myzelienwachstum nur in hohen Konzentrationen hemmt, d. h. wenn das Eisenhydroxyd-Gel an der Myzelienoberfläche ausgefällt wird, bestätigt werden.

3. Atmungs- und Redoxpotentialveränderung der in Betriebsnährböden gezüchteten Kulturen auf die Einwirkung von Schwermetallen

In dieser Versuchsreihe sollte die Wirkung derjenigen Metalle auf Atmung und RP von Streptomyces-Kulturen geprüft werden, die infolge der Korrosion aus den in Antibiotikumbetrieben verwendeten Eisenfermentoren in den Nährboden gelangen können.

Kulturen, die in Betriebsnährböden gezüchtet worden waren, wurden mit Lösungen der betreffenden Metallsalze (Cu-, Co, Mn, Fe, Cr, Ni, V, Mo) versetzt

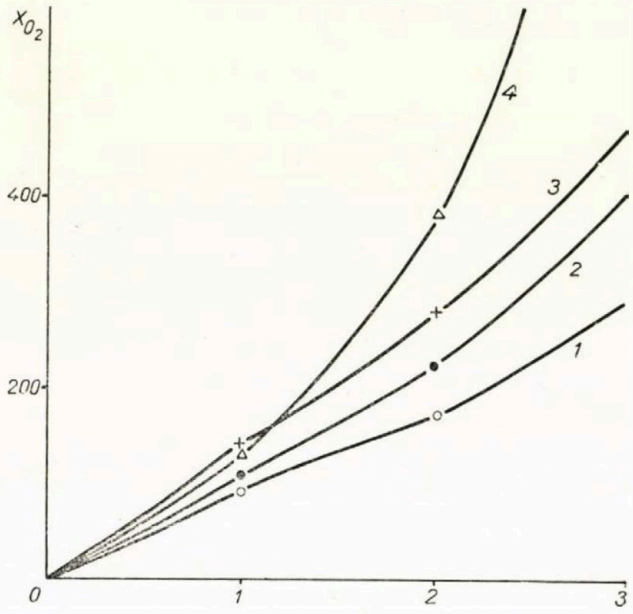


Abb. 5. Veränderung der Atmung der Streptomyces griseus-Kulturen auf Wirkung von Mangan-Nickel- und Vanadiumionen (Konzentration 60 γ/ml.)
Kurve 1: Atmung der unbehandelten Kontrollkultur
« 2: « « mit Mangan behandelten Kultur
« 3: « « « Nickel « «
« 4: « « « Vanadium « « (in Stunden)

und dann auf Atmung und Redoxpotential untersucht. Aus den Messungsergebnissen geht hervor, dass Kobalt-, Chrom-, Eisen- und Molybdänionen die Atmung nicht beeinflussen, während Eisen in der 2. Stunde eine 20%ige Herabsetzung herbeiführt und Mangan, Nickel und Vanadium eine bedeutende Steigerung bewirken (Abb. 5).

Die beträchtlichste RP-Erhöhung kommt auf die Wirkung der Vanadium- und Manganionen zustande (Abb. 6/a). Kupfer verursacht eine Herabsetzung um 100 mV, während die übrigen Metalle keine wesentlichen Veränderungen hervorrufen (Abb. 6/b). Dies erklärt sich daraus, dass die Ionen der zu den

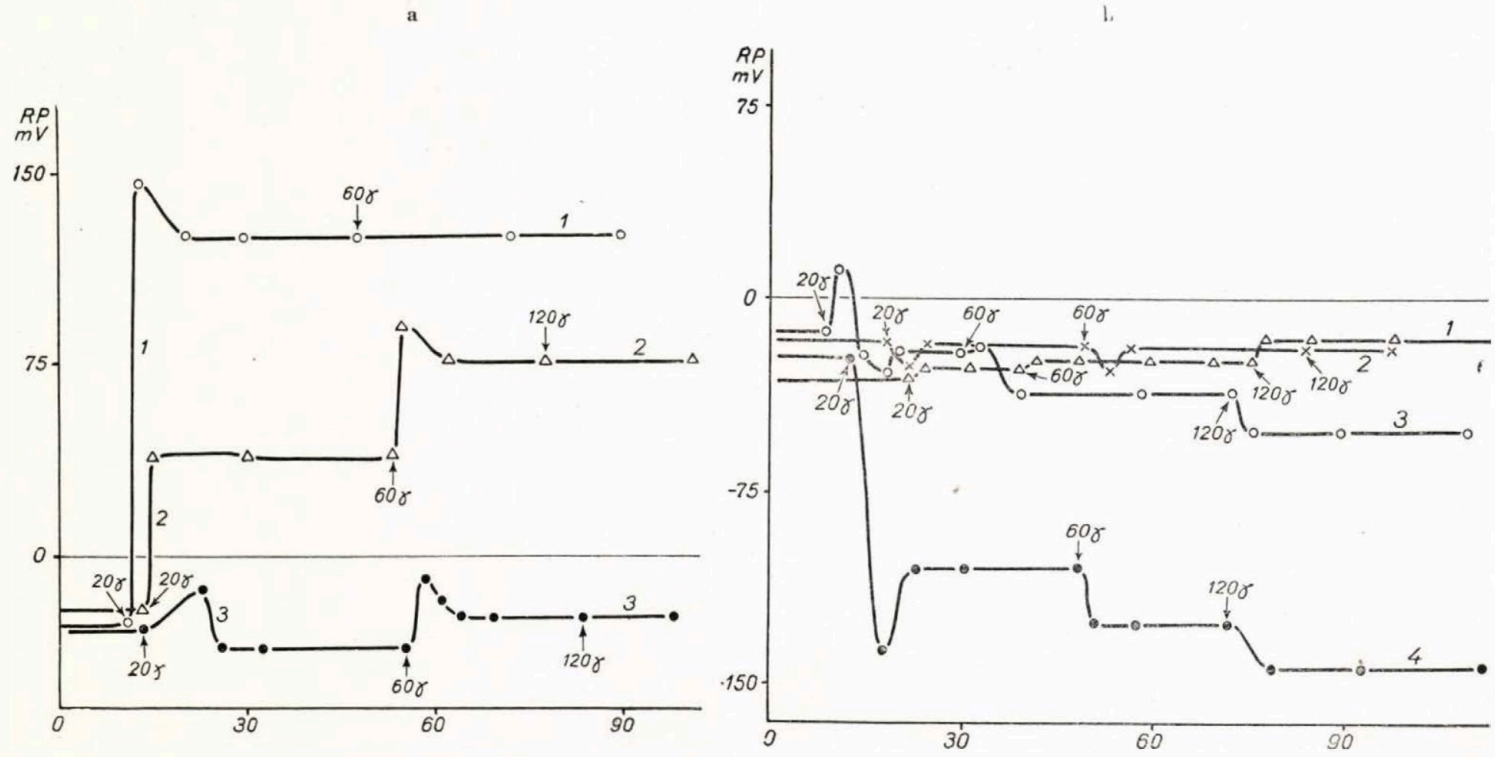


Abb. 6. RP-Veränderung der Streptomyces griseus-Kultur auf Wirkung verschiedener Metalle in Betriebsnährböden (in Minuten)

a) Kurve 1: RP-Veränderung nach Vanadium
« 2: « « Mangan
« 3: « « Eisen
b) « 1: « « Nickel
« 2: « « Kobalt
« 3: « « Chrom
« 4: « « Kupfer

Kulturen hinzugefügten Metalle als Redoxsysteme nur eine geringe Redoxkapazität besitzen, die von den Zellen als einem System, welches die RP-verändernden Faktoren laufend produziert, bald erschöpft wird [12]. Besonders gut wird dies durch die zum Eisenversuch gehörende Redoxkurve veranschaulicht, wo in Gegenwart von 20—60 γ/ml Eisen die RP-Erhöhung alsbald wieder einer Senkung Platz macht. Eine weitere Steigerung der Eisenmenge bleibt schon ohne Einfluss auf den Kurvenverlauf, da hier bei dem steigenden pH bereits mit einer Ausfällung des Eisens zu rechnen ist, die wir übrigens auch analystich nachgewiesen haben.

Besprechung

Die Versuche haben gezeigt, dass — während an Hand von Atmungsuntersuchungen die Wirkung der Schwermetallionen, die von den Spurenelementen bzw. der Korrosion der Fermentoren herrühren, oft kaum nachweisbar ist — die Redoxpotentialmessungen die im Stoffwechsel vor sich gehenden Veränderungen gewöhnlich empfindlicher registrieren. In Anbetracht dessen, dass ein Redoxsystem den Stoffwechsel der Zellen nur dann verändert, wenn diese es chemisch binden, kann auf Grund von Redoxmessungen diejenige maximale Metallionenmenge ermittelt werden, die die Zellen noch zu binden imstande sind.

Die Wirkung der durch Korrosion in den Nährboden gelangenden grösseren Mengen solcher Stoffe wird von den Zellen kompensiert, indem sie die Redoxkapazität derselben mit ihren Stoffwechselprodukten erschöpfen.

Die durch die in den Nährboden geratenen Metalle bedingten Redoxverhältnisse lassen auch Schlüsse auf die Streptomycinproduktion zu. Die Streptomycinproduktion geht nämlich in einem bestimmten Redoxintervall vor sich. Wird also das RP der Kultur durch irgendeine Substanz bis zu einem gewissen Grad stabilisiert (z. B. durch Zink), so wird die Produktionsphase verlängert, d. h. die Streptomycinproduktion wird längere Zeit anhalten. Die aus der Korrosion des Eisens stammenden Ionen verursachen keine wesentliche Veränderung im RP der Streptomyces griseus-Kultur, weshalb diese Stoffe die Streptomycinproduktion nicht in grösserem Masse beeinflussen werden. Dies konnten wir auch experimentell beweisen, indem wir mit entsprechenden Salpetersäuremengen aus Walz- bzw. Gusseisen hergestellte Lösungen neutralisiert zu den Kulturen gaben und daraufhin keinerlei Veränderung gegenüber den Kontrollen feststellen konnten.

ZUSAMMENFASSUNG

In Streptomyces griseus-Kulturen wurde die Wirkung verschiedener Schwermetalle auf die Atmung und das Redoxpotential in Betriebs-, synthetischen und spurenelementfrei gemachten synthetischen Nährböden untersucht und festgestellt, dass die Streptomycinproduktion nur von den Ionen solcher Metalle beeinflusst wird, die eine wesentliche Veränderung des Redox-

potentials herbeiführen. Auf Grund dieser Ergebnisse konnte festgestellt werden, dass die zur Streptomycinproduktion benötigten Einrichtungen auch aus Eisen hergestellt sein dürfen.

LITERATUR

1. *Oginsky, E. L., Smith, P. H.* und *Umbreit, W. W.:* J. Bact., **61,** 639 (1951).
2. *Haley, G. M., Morgan, J. F.* und *Parker, R. C:* J. Biol. Chem. **189,** 305 (1952).
3. *Rake, G.* und *Donovick, R.:* J. Bact. **52,** 223 (1950).
4. *Thornberry, H. H.* und *Anderson, H. W.:* Arch. Bioch. **16,** 389 (1948).
5. *Chesters, P.* und *Robindson, S. F.:* J. gen. Microbiol. **5,** 539 (1951).
6. und 7. *Krámli, A.* und Mitarb.: Acta Biologica Hung. (im Druck).
8. *Krámli, A.* und Mitarb.: Biológiai Közlemények (im Druck).
9. *Klosa, J.:* Antibiotica (Verlag Technik Berlin) 205 (1952).
10. *Donald, M.* und Mitarb.: J. gen. Microbiol. **7,** 211 (1952).
11. *Asai T.* und Mitarb.: J. Antibiotics (Tokyo) **3,** 25 (1950).
12. *Krámli, A.:* Biologiai Közlemények V, 1. (1954).

ВЛИЯНИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА ДЫХАНИЕ И ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ КУЛЬТУР STREPTOMYCES GRISEUS

А. Крамли, Э. Ф. Петтко и *П. Кишш*

Резюме

В своих опытах авторы изучали влияние следовых элементов, возникающих возможно вследствие коррозии бродильных чанов, на дыхание и на изменение окислительно-восстановительного потенциала (ОВП) Streptomyces griseus. Авторы определили, что кривые дыхания и ОВП являются зеркальным изображением один другого (рис. 1), и что дыхание мицелия Streptomyces griseus начинается также в присутствии только одного иона марганца. В среде, лишенной следовых элементов, роста совершенно не наблюдается, о чем свидетельствует и остановка кривой ОВП на постоянном уровне (рис. 2). Исследуя влияние различных металлов в культурах синтетической и лишенной следовых элементов среды, авторы установили, что только железо и ванадий усиляли в значительной степени дыхание (рис. 3). В то же время при одинаковых условиях ванадий стойко повысил ОВП, а влияние прочих металлов нейтрализировалось клетками (рис. 4). У культур, выращенных в производственной среде, марганец, никель и ванадий усиляли дыхание при концентрации в 60 гамма/мл (рис. 5), а прочие металлы не оказывали значительного влияния на дыхание, даже и в случаях других концентраций. В производственной среде ванадий и марганец повышали, а медь понижала ОВП (рис. 6).

На основе результатов опытов авторы установили, что путем исследования дыхания едва обнаруживается влияние ионов металлов, происходящих возможно вследствие коррозии, в то время как результаты измерений ОВП вообще более чувствительно отражают происходящие в обмене веществ изменения.

Влияние ОВП значительного количества ионов тяжелых металлов, попадающих в среду вследствие коррозии, нейтрализуется клетками путем истощения окислительно-восстановительной мощности ионов продуктами своего обмена веществ.

Ионы, происходящие вследствие коррозии железа, не изменяют в значительной степени ОВП культур Streptomyces griseus. Следовательно, они не оказывают значительного влияния и на производство стрептомицина.

TRANSFORMATIONSMECHANISMEN DER RHIZOBIEN

I—III

Von
R. BALASSA

Genetische Abteilung
des Agrobiologischen Institutes der Ungarischen Akademie der Wissenschaften

(Eingegangen am 20. November 1953)

Einleitung

Es besteht bisher keine einheitliche Auffassung darüber, welche Erscheinungen zu den Transformationen (vegetative Hybridisation von Bakterien) zu zählen sind. Verallgemeinert fasst man unter diesem Begriff solche Veränderungen zusammen, die ein Mikroorganismus infolge der Wirkung eines anderen Mikroorganismus oder seiner Stoffwechselprodukte ausbildet, doch dehnen einzelne Autoren den Begriff so weit aus, dass sie selbst die vegetative Hybridisation höherer Pflanzen mit Transformationsprozessen in Zusammenhang bringen [14], während andere ihn nur auf die Wechselwirkung zweier *lebender* Mikroorganismen beschränkt wissen wollen [24].

Auch über die Natur der Stoffe, welche Transformationsprozesse auszulösen vermögen, sind die Meinungen geteilt. Genauer gesagt, es besteht keine einheitliche Auffassung darüber, ob *nur* jene Prozesse zu den Transformationen zu zählen sind, die durch bereits bekannte Stoffe ausgelöst werden, oder ob jedwede Veränderung, die durch jedwede bakterielle Stoffwechselprodukte hervorgerufen wird, gegebenenfalls als Transformationserscheinung aufzufassen ist. (Den vollständigsten Überblick über die diesbezügliche Literatur gibt die Monographie von *Kalina* «Vegatative Hybridisation von Bakterien», auf die im nachstehenden häufig Bezug genommen wird [10].)

Das Ziel der hier besprochenen Untersuchungen war, einen Einblick in die Dynamik des bislang nahezu unbekannten Mechanismus der Transformationserscheinungen zu gewinnen. Wir wendeten darum unsere Aufmerksamkeit nach anfänglichem Registrieren der beobachteten Erscheinungen jenen Bedingungen zu, unter welchen einzelne Transformationserscheinungen auftreten, ohne die Untersuchungen auch auf die Bestimmung der wirksamen Stoffe auszudehnen. Hierbei erwies es sich als notwendig, den Begriff der Transformation — zumindest provisorisch und vielleicht auch willkürlich — zu umgrenzen.

Wir fassen jene Veränderungen als Transformationen auf, welche in einem lebenden Mikroorganismus durch jene Zellbestandteile eines anderen Mikroorganismus hervorgerufen werden, welche bereits art- oder typusspezifische

Eigenschaften besitzen oder solche unmittelbar hervorrufen können. Es werden also die Transformationen von all jenen Veränderungen abgesondert, welche durch bakterielle Produkte ausgelöst werden, die über keine art- oder typusspezifische Eigenschaften verfügen. Wir sehen demnach in den Transformationen eine überaus primitive Form der Hybridisationen, mit der Einschränkung, dass das Wesen der Hybridisation — sowohl der vegetativen als auch der generativen — in der wechselseitigen Assimilation zweier genetisch verschiedener Organismen besteht *(Lyssenko)*, während bei den Transformationen nur die eine Komponente veränderungsfähig ist.

Auf Grund der Literaturangaben wird es hier als erwiesen angesehen, dass das wirksame Prinzip dieser Zellbestandteile hochpolymere Desoxyribonukleinsäure (DNS) enthält, weil die Entfernung oder der Abbau der DNS in allen untersuchten Fällen — mit einer einzigen Ausnahme [13] — zur Inaktivierung der wirksamen Substanz führte [16]. Auch ist es seit den Forschungen von *Avery* [4] bekannt und wurde seither von anderen Autoren wiederholt bestätigt [1, 6, 10], dass gereinigte DNS-Präparate Transformationserscheinungen auszulösen vermögen. Demgegenüber gelang es bisher noch nicht, mit anderen, als artspezifisch angesehenen Substanzen, welche jedoch DNS nicht enthalten, Transformationserscheinungen hervorzurufen [2, 10, 19].

Als nicht erwiesen wird dagegen angesehen, dass die Desoxyribonukleinsäuren bei jeder Transformationserscheinung die kleinste Einheit des wirksamen Prinzips darstellen. Bei einigen der beschriebenen Erscheinungen sind möglicherweise grössere DNS-haltige Einheiten (Nukloproteide) anwesend [13], während bei anderen zweifellos filtrierbare Formen eine Rolle spielen [8, 23].

I. Transformationserscheinungen bei Rhizobien

Die Zahl jener Bakterienarten, zwischen welchen oder innerhalb welcher Transformationserscheinungen beobachtet wurden, nahm in den letzten Jahren zu, ist indessen noch immer sehr gering. Hierzu kommt, dass die Transformationsforschung sich lange Zeit nur einseitig entwickelte, indem sie sich grösstenteils nur mit den Veränderungen der Pathogenität, der Virulenz und der Antigenstruktur befasste und die deren Grundlage bildenden Stoffwechselveränderungen vernachlässigte.

Der Versuch, Rhizobien in die Transformationsforschung einzubeziehen, schien in vieler Hinsicht begründet. Es handelt sich hier um eine physiologisch wichtige Gruppe, die sich durch die Wirtspflanzenspezifität der einzelnen Arten, durch ihre von dieser abweichende Antigenstrukturspezifität und durch die äusserst charakteristischen Unterschiede im Stoffwechseltypus einzelner Stämme möglicherweise besonders dazu eignet, zur Erweiterung und Vertiefung unserer bisherigen Kenntnisse auf diesem Gebiete beizutragen.

Schon *Krassilnikow* hatte einige Transformationserscheinungen an Rhizobien nachgewiesen [12]. Hierbei zeigte es sich, dass Rhizobien, die auf dem Filtrat von anderen Rhizobienarten gezüchtet wurden, nach mehrere Monate dauernden Passagen die Fähigkeit erwarben, an der Wirtspflanze der induzierenden Art Knöllchen zu bilden. Im Laufe der hier beschriebenen Versuche wurde nun angestrebt, ausser einer genaueren Analyse dieser Veränderungen auch noch andere Transformationserscheinungen je vollständiger zu registrieren. Da die von *Krassilnikow* beobachtete langsame Ausbildung der Veränderungen eine Ausweitung der Versuche ausserordentlich erschwert hätte, gelangten auch methodische Fragen in den Vordergund.

Über diese Untersuchungen berichteten wir bereits im Jahre 1953 [5]. Wir beschränken uns hier deshalb nur auf die Wiedergabe einiger der erzielten Ergebnisse und eines Teiles der Methodik.

Methodischer Teil

Die Durchsicht der diesbezüglichen Literatur ergibt, dass zur Erzielung von Transformationserscheinungen in vitro bisher folgende Methoden zur Anwendung gelangten [10]:

a) Gemeinsame Züchtung zweier Arten.

b) Züchtung der umzugestaltenden Art auf dem Kulturfiltrat der anderen Art.

c) Züchtung der umzugestaltenden Art auf den abgetöteten Zellen der anderen Art.

d) Züchtung der umzugestaltenden Art auf dem Autolysat der anderen Art.

e) Züchtung der umzugestaltenden Art auf der aufgeschlossenen Zellsubstanz der anderen Art.

f) Züchtung der umzugestaltenden Art auf dem DNS-Extrakt der anderen Art.

Veränderungen, insbesondere solche, die auf tiefergreifenden Stoffwechselveränderungen beruhen als jene serologischen Charakters, zeigten sich in der überwiegenden Zahl der Fälle — abgesehen von einzelnen äusserst günstigen Versuchsobjekten — nur nach zahlreichen Passagen.

Die transformativen Veränderungen hängen von zwei Vorbedingungen ab:

a) Anwesenheit der DNS-haltigen Zellkomponente in nicht depolymerisierter Form,

b) Übernahme der wirksamen Substanz durch die zu verändernden Zellen.

Der ersten Bedingung entspricht am wenigsten die gemeinsame Züchtung zweier lebender Organismen oder die Anwendung von Kulturfiltraten. In beiden Fällen tritt DNS vermutlich nur aus den in einer verhältnismässig geringen Zahl vorhandenen, schon abgestorbenen Zellen aus. Autolyse birgt die Gefahr ungenügenden oder bereits zu weit fortgeschrittenen Abbaues. Die Anwendung von gereinigten DNS-Präparaten entzieht möglicherweise jene Veränderungen der Beobachtung, die an die Anwesenheit grösserer Einheiten gebunden sind.

Am zweckmässigsten erscheint eine schonungsvolle Aufschliessung der Zellen der induzierenden Komponente. Meist konnten jedoch positive Ergebnisse auch auf solchem aufgeschlossenen Zellmaterial erst nach einer langen Reihe von Passagen erzielt werden. Worin besteht nun die Rolle der Passagen? Da nur junge Zellen zur Variantenbildung fähig sind, gewährleisten wiederholte Passagen die längere Gegenwart junger Zellen.

Auf Grund dieser Überlegungen wurde nun versucht, die Bedingungen der Zellaufschliessung und der Übertragung der wirksamen Stoffe zu modifizieren. Es bedurfte zahlreicher Versuche, bis ein Verfahren gefunden wurde, welches die Passagen überflüssig macht. Das Wesen dieses Verfahrens besteht darin, dass die durch Ultraschall aufgeschlossene und hernach mit Hitze behandelte Zellsubstanz der die Transformation induzierenden Zellen — die induzierende Komponente — mit der lebenden Zellensuspension des zu induzierenden Organismus — der induzierten Komponente — gemeinsam einer milden Ultraschallbestrahlung unterworfen wurde.* Die ursprüngliche Annahme, dass die gemeinsame Ultrastrahlbehandlung zu einer

* Die Ultraschallbestrahlungen wurden teilweise im Zentralinstitut für Physik der Ungarischen Akademie der Wissenschaften unter Mithilfe der Ultraschallgruppe von *T. Tarnóczy* und teilweise im Biochemischen Institut der Ungarischen Akademie der Wissenschaften durchgeführt.

besseren Dispersion der wirksamen Substanz und zu einer Zunahme der Zahl und Intensität der Berührungen zwischen den beiden Komponenten führen werde, erwies sich als ungenügend. Wie später gezeigt werden soll, ist die Bindung der fremden Zellsubstanz an die lebenden Zellen als ein Adsorptionsprozess anzusehen. Welche Rolle hierbei dem Ultraschall zukommt, ist noch in gesonderten Untersuchungen zu klären. Aus diesem Grunde ist die hier angewandte Methode vorläufig als empirisch zu betrachten.

Als grosser Vorteil erwies sich, dass eine einzige Behandlung mit nachfolgender Anreicherung auf «optimaler» Nährlösung zur Bildung von Varianten führte und dass diese Methode gut reproduzierbare Resultate ergab.

Der Gang des angewandten Verfahrens (kurz: Ultraschalltransformation) ist aus Abb. 1 ersichtlich.

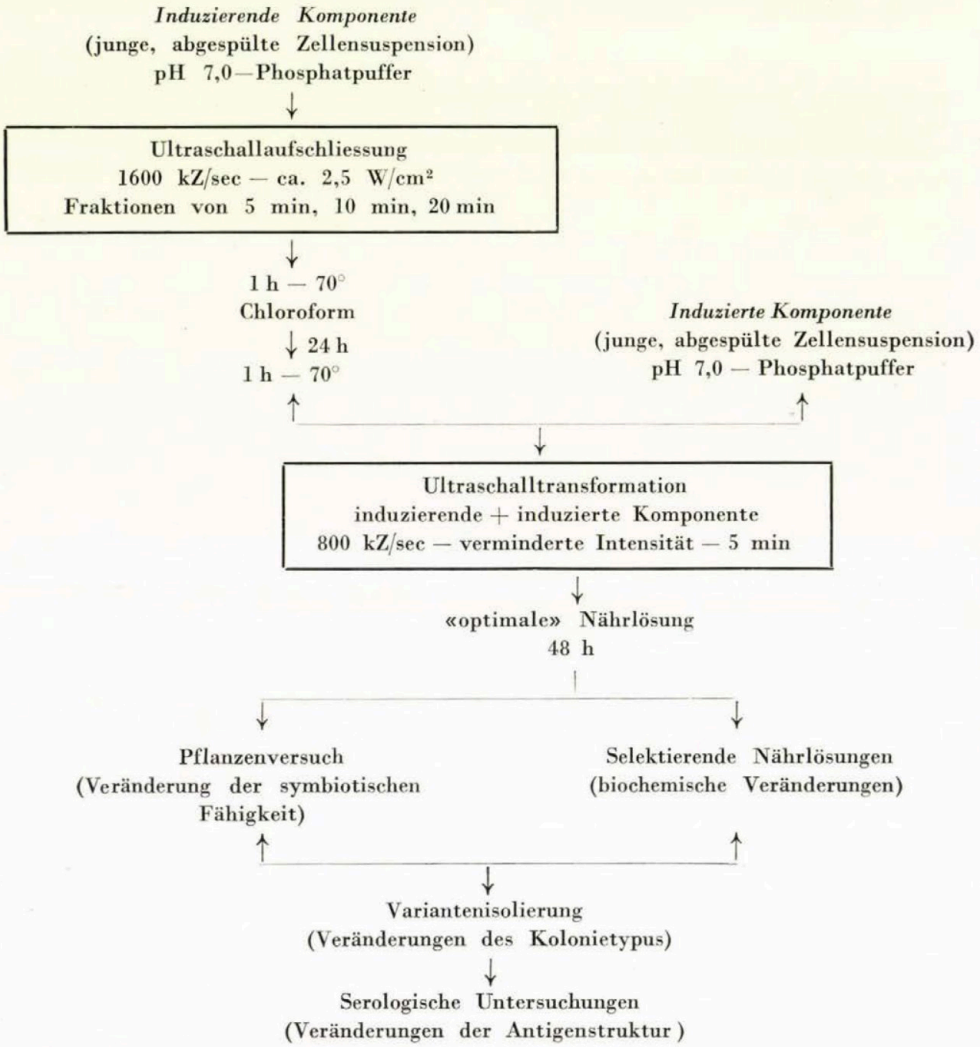


Abb. 1. Transformation mit Ultraschallbestrahlung. Schematische Darstellung. «Optimale» Nährlösung: 0,2 g K_2HPO_4 + 0,2 g $MgSO_47H_2O$ + 20 g Saccharose + 3 g aufgekochter und filtrierter Extrakt von Luzernenmehl + 1000 ml dest. Wasser. pH 6,8—7,0

Die Zellen wurden von den Agarkulturen zu Beginn des wahrnehmbaren Wachstums abgespült. Die Zellendichte beider Komponenten wurde mit Hilfe des *Lange*-Kolorimeters auf einen Extinktionswert von 0,1 eingestellt. Von den verschieden lang bestrahlten Fraktionen der induzierenden Komponente wurden jene benutzt, bei denen die Mehrzahl der Zellen beschädigt war, die jedoch auch noch unversehrte Zellen enthielten.

Die gemeinsame Ultraschallbehandlung der beiden Komponenten — die eigentliche Transformation — wurde zur Abschwächung der Intensität anstatt in Röhrchen mit Zellophanboden in normalen Röhrchen durchgeführt.

Zu jedem Hauptversuch wurden drei Kontrollen angesetzt, um möglicherweise auftretende unspezifische Ultraschalleffekte auszuschliessen (Tabelle I).

TABELLE I

Ultraschalltransformation. Die Kontrollen des Verfahrens

	Induzierende Komponente	Induzierte Komponente	Kombinationen
Hauptversuch	***x***	y	***x*** → y
1. Kontrolle	***y***	y	***y*** → y
2. Kontrolle	***x***	—	***x*** → —
3. Kontrolle	—	y	— → y

Fett gedruckt : aufgeschlossene und abgetötete Zellensuspension.

In den Kontrollen konnte nie eine Variantenbildung nachgewiesen werden, so dass später die 3. Kontrolle (Ultraschallbestrahlung des induzierten Organismus allein) weggelassen wurde.

Experimenteller Teil und Besprechung der Ergebnisse

In der obenerwähnten Arbeit [5] wurden drei Gruppen von Veränderungen nachgewiesen, nämlich Veränderungen der symbiotischen Eigenschaften mittels Pflanzenversuches, biochemische Veränderungen mittels selektiver Nährböden und Veränderungen der Antigenstruktur mittels Kreuzagglutinationen.

Zwischen verschiedenen Rhizobienarten wurden in verschiedenen Kombinationen folgende Transformationserscheinungen beobachtet :

1. Veränderung der Knöllchenbildungsfähigkeit (Virulenz) unter Ausbildung einer neuen Wirtspflanzenspezifität.
2. Zu- oder Abnahme des Stickstoffbindungsvermögens (Effektivität).
3. Veränderung einiger konstanter biochemischer Eigenschaften, die sich entweder in der Anpassung an den Typus des induzierenden Stammes oder in der Ausbildung eines von beiden Komponenten abweichenden Typus auswirkte (Biotinanspruch, Triphenyltetrazoliumchlorid-Reduktion auf verschiedenen Kohlenhydratquellen).

4. Veränderung der Penicillin- und Streptomycinempfindlichkeit.

5. Veränderung des Kolonietypus.

6. Veränderungen der Antigenstruktur, die in einem mehr oder minder stark ausgeprägten Verlust des ursprünglichen somatischen und Geisselantigenbestandes sowie in der ebensolchen Ausbildung der somatischen und — seltener — Geisselantigene des induzierenden Stammes zutage traten.

Die meisten der in der Literatur beschriebenen Transformationserscheinungen liessen sich also zwischen den einzelnen Arten der Gattung Rhizobium hervorrufen, doch traten auch Veränderungen auf, die bislang noch nicht beobachtet wurden.

Kalina teilt die Transformationserscheinungen in zwei Gruppen ein:

1. in Veränderungen, welche den Rahmen der Art nicht überschreiten und so als Merkmale der Variabilität innerhalb der Art aufgefasst werden können;

2. in Veränderungen, die zur Entstehung einer neuen Art führen.

Es kann angenommen werden, dass auch die ihnen zu Grunde liegenden Mechanismen verschieden sind.

Die globale Natur der hier durchgeführten Versuche schloss die Möglichkeit aus, die beobachteten Veränderungen nach diesen Gesichtspunkten zu klassifizieren. Immerhin konnte das allgemeine Bild gewonnen werden, dass die einzelnen Veränderungen — Stickstoffbindung, Veränderungen einzelner biochemischer Eigenschaften, Veränderungen der Antigenstruktur — manchmal getrennt auftraten, meistens aber zum Teil und manchmal sogar ganz zusammenfielen. Einzelne Varianten zeigten eine vollständige Anpassung an die induzierende Art, was darauf hinweist, dass verschiedene Mechanismen zur Geltung kamen.

Diese Feststellungen bewogen uns, die Rhizobien auch weiterhin, beim näheren Eingehen auf den Transformationsmechanismus der Bakterien, als Versuchsobjekt beizubehalten.

Zusammenfassung des I. Teils

Transformationen zwischen Rhizobien führen zur Bildung mannigfaltiger Varianten, die in der Veränderung der Knöllchenbildungsfähigkeit, der Stickstoffbindung, der Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika, einzelner biochemischer Eigenschaften und der Antigenstruktur zum Ausdruck kommen. Diese Veränderungen treten manchmal vereinzelt auf, manchmal wieder erstrecken sie sich auf einige oder alle untersuchten Eigenschaften.

Die bisher gebräuchlichen Verfahren wurden durch ein neues Verfahren ersetzt, bei welchem die induzierende Zellsubstanz und die zu induzierenden Zellen einer gemeinsamen Ultraschallbehandlung unterworfen wurden. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass bereits eine einzige Behandlung zur Variantenbildung führt.

II. Die transformative Ausbildung der Streptomycinresistenz zwischen streptomycinresistenten Varianten und der Ausgangsform ein und desselben Stammes

Angaben über die biochemische Analyse des Transformationsmechanismus finden sich in der Literatur nur wenige. Neuerdings wurden im Zusammenhang mit den Pneumokokkentransformationen verschiedene Transformationstypen sehr eingehend untersucht [3, 9, 21]. Da jedoch diese Autoren die verschiedenen Transformationserscheinungen mit der Übertragung einer jeweilig autonomen genetischen Einheit erklären, welche ihre genetische Autonomie auch *nach* ihrem Einbau in den Organismus behält, erstreckten sich ihre Untersuchungen nicht auf jene Bedingungen, die die Eingliederung der aus der Umgebung aufgenommenen Substanz in den einheitlichen Bestand der Zelle ermöglichen.

Um auf diesem Gebiete biochemisch erfassbare Ergebnisse erhalten zu können, beschränkten wir uns vorerst auf die Untersuchung einer gut umschriebenen Erscheinung. Als solche erschien die auf transformativem Wege erfolgende Ausbildung der Streptomycin- (STRM)- Resistenz als äusserst geeignet.

Im Laufe der Versuche machten wir eine interessante Beobachtung. Bei dem Versuch, auf transformativem Wege zu STRM-resistenten Varianten zu gelangen, gingen wir nach dem in Abb. 1 veranschaulichten Verfahren vor, unterwarfen also die als induzierende Komponente verwendete Suspension aufgeschlossener und hitzebehandelter Zellen STRM-resistenter Stämme einer gemeinsamen Ultraschallbehandlung mit Zellen eines empfindlichen Stammes. Das so behandelte Material, das nach unserer damaligen Annahme bereits transformierte Zellen — Varianten — enthielt, wurde auf einem optimalen Nährboden (Nährboden mit Luzernenmehlextrakt) angereichert. Die Varianten wurden sodann auf STRM-haltigem, «optimalem» Nährboden selektiert. Hierbei wurde beobachtet, dass keine Bildung von Varianten eintritt, wenn die Anreicherung auf «optimalem» Nährboden unterbleibt und das mit Ultraschall bestrahlte Material unmittelbar in das STRM-haltige Medium gebracht wird. Weitere Versuche zeigten, dass sich auch dann keine Varianten bildeten, wenn man zwar den ausgelassenen Schritt — die Anreicherung — wieder einschaltet, doch anstelle des erwähnten «optimalen» Nährbodens ein synthetisches, als Stickstoffquelle Ammoniumsulfat enthaltendes Medium verwendet, auf dem der Stamm sonst sehr gut gedeiht. Wurde als Stickstoffquelle Kaseinhydrolysat verwendet, so konnte die Bildung von Varianten wiederum nachgewiesen werden, doch nur dann, wenn die Zellen im kaseinhydrolysathaltigen Medium über die Lag-Phase hinaus verblieben (Abb. 2).

Auf Grund dieser Feststellungen wurde es möglich, im Transformationsmechanismus zwei Phasen zu unterscheiden. Die erste Phase, in welcher die

wirksame Substanz auf die Oberfläche oder in das Innere der Zellen gelangt, tritt bereits während einer wenige Minuten dauernden Ultraschallbehandlung oder unmittelbar danach — also wahrscheinlich auch bei sich nicht teilenden Zellen — ein. Diese mechanische Übernahme der transformierenden Substanz gewährleistet aber an und für sich noch nicht die Ausbildung von Varianten. Diese erfogt erst in der zweiten Phase, in welcher die die neuen Eigenschaften noch nicht besitzenden Zellen die bereits adsorbierte fremde Zellsubstanz assimilieren und neue Stoffwechseltypen ausbilden. In diesem Prozess spielen anscheinend eine oder mehrere Aminosäuren des Kaseinhydrolysats eine Rolle.

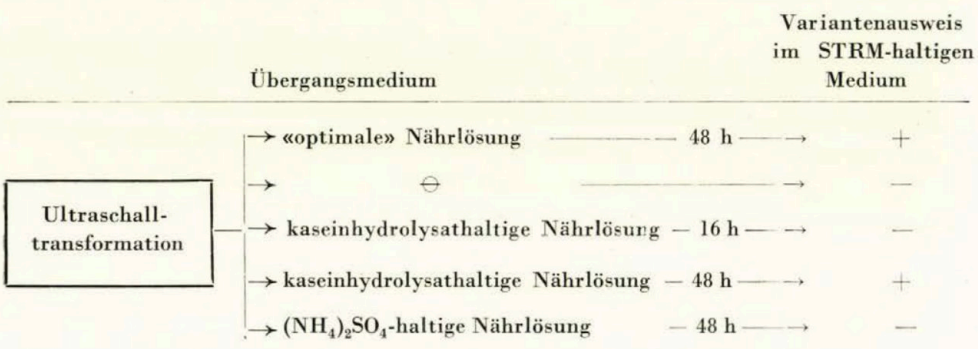


Abb. 2. Ausbildung STRM-resistenter Varianten nach Ultraschalltransformation auf verschiedenen Stickstoffquellen
«Optimale» Nährlösung: wie in Abb. 1.
Kaseinhydrolysathaltige Nährlösung: Grundnährlösung + 1000 µg/ml Kaseinhydrolysat
$(NH_4)_2SO_4$-haltige Nährlösung: Grundnährlösung + 500 µg/ml Ammoniumsulfat
STRM-haltiges Medium: Kaseinhydrolysat + 1 µg/ml STRM
+ : Variantenbildung
— : keine Variantenbildung

Der Umstand, dass diese zweite Phase durch Aussenfaktoren beeinflusst werden kann, bietet die Möglichkeit, den oben beschriebenen Mechanismus mit jenem zu vergleichen, nach welchem sich die Resistenz in Gegenwart des Antibiotikums ausbildet. Der Vergleich der beiden Mechanismen ist auch deswegen von Interesse, weil in den substrat- bzw. antibiotikumbedingten Veränderungen einerseits und in den transformativen Veränderungen andererseits zwei biologische Grundsätze zur Geltung gelangen, nämlich die Veränderung des lebenden Organismus 1. durch Aussenfaktoren und 2. durch die Wechselwirkung des Stoffwechsels zweier genetisch verschiedener Organismen.

Diese Feststellungen ermöglichen folgende Fragestellung:

Auf welche Weise beeinflussen einzelne Faktoren — insbesondere einzeln Aminosäuren des Kaseinhydrolysats — die Ausbildung der STRM-Resistenz wenn diese *A)* infolge der direkten Einwirkung von STRM oder *B)* infolge der Wirkung von STRM-resistentem Zellenmaterial eintritt?

A) *Die Ausbildung der Streptomycinresistenz infolge Einwirkung von Streptomycin*

Die STRM-Empfindlichkeit der Rhizobien ist nicht artspezifisch. Innerhalb mehrerer untersuchter Arten fanden sich Stämme mit nahezu voller STRM-Resistenz, dann solche, die nur über eine geringere Resistenz verfügten, und schliesslich auch ausserordentlich empfindliche Stämme. Bei den empfindlichen oder nur über eine geringe Resistenz verfügenden Stämmen war der Charakter der Resistenzausbildung gleichfalls sehr unterschiedlich. Bei einigen Stämmen gelang es überhaupt nicht, eine stärkere Resistenz hervorzurufen, während sich bei anderen in ein oder zwei Schritten sprunghaft eine überaus starke Resistenz ausbildete.

Methodischer Teil

Auswahl der Stämme:

Als Versuchsobjekte wurden Stämme gesucht, bei denen sich die Resistenz zwar rasch, aber stufenweise ausbildet. Unter diesen wurden ein mit *H* bezeichneter Rhizobium lupini-Stamm und ein mit *M* bezeichneter Rhizobium meliloti-Stamm ausgewählt. Einige Eigenschaften dieser Stämme sind in Tabell II angegeben. Wie ersichtlich, unterscheidet sich ihr Stoffwechseltypus in mehrfacher Beziehung voneinander, so im Spektrum der als alleinige Stickstoff- bzw. Kohlenhydratquelle verwendbaren Aminosäuren, im Spektrum der Kohlenhydratquellen sowie in ihrem Biotinanspruch. Das Wachstum des Stammes *M* ist langsam, das des Stammes *H* rasch. Der Stamm *H* weist einen Kolonietypus auf, der sich von dem anderer Rhizobien, so auch vom Stamm *M*, insbesondere in bezug auf seine Grösse charakteristisch unterscheidet. Dagegen beträgt die Streptomycinempfindlichkeit bei beiden Stämmen weniger als 2 μg/ml.

Nährlösungen:

In sämtlichen Versuchen wurde für beide Stämme folgende Stammlösung benutzt (in einer Menge von 2 ml je Röhrchen): 4,5 g KH_2PO_4 + 0,5 g KCl + 0,05 g $MgSO_4 7H_2O$ + 5,0 g Glukose + 4,0 μg Ferriammoniumzitrat + 0,03 μg Biotin + 1000 ml dest. Wasser. pH 7,2.

Zu dieser Lösung wurden die zu untersuchenden Stickstoffquellen in der für das Wachstum optimalen Konzentration hinzugefügt.

Ausbildung der Resistenz:

Die Ausbildung der Resistenz erfolgte nach dem aus der Literatur wohlbekannten Verfahren der Anwendung von Passagen in Anwesenheit steigender STRM-Konzentrationen.

Sie wurde auf folgenden Stickstoffquellen untersucht:

Stamm *M:* Kaseinhydrolysat, Ammoniumsulfat, Histidin, Asparaginsäure, l-Lysin, Arginin, Harnstoff.

Stamm *H:* Kaseinhydrolysat, Ammoniumsulfat, Histidin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Arginin, Harnstoff, Zystin, dl-Serin, dl-Threonin, dl-Phenylalanin, dl-Leucin.

Bezeichnungen:

Aus den sich auf STRM selektierenden Variantenpopulationen wurden einzelne Varianten durch Plattengiessen isoliert und mit «R_X» bezeichnet. Hierbei zeigt «X» jene STRM-Konzentration in μg/ml an, bei der die betreffende Variante ausgebildet wurde.

Experimenteller Teil

Die Ausbildung der STRM-Resistenz ist aus Abb. 3 ersichtlich. Zur besseren Übersichtlichkeit werden nur einige Kurven vorgeführt. Die übrigen untersuchten Stickstoffquellen ergaben Werte, die zwischen diese fallen. Es ist deutlich zu sehen, dass in der Entwicklung der Resistenz wesentliche Unterschiede zwischen den einzelnen Stickstoffquellen bestehen. Bei beiden Stämmen bildet

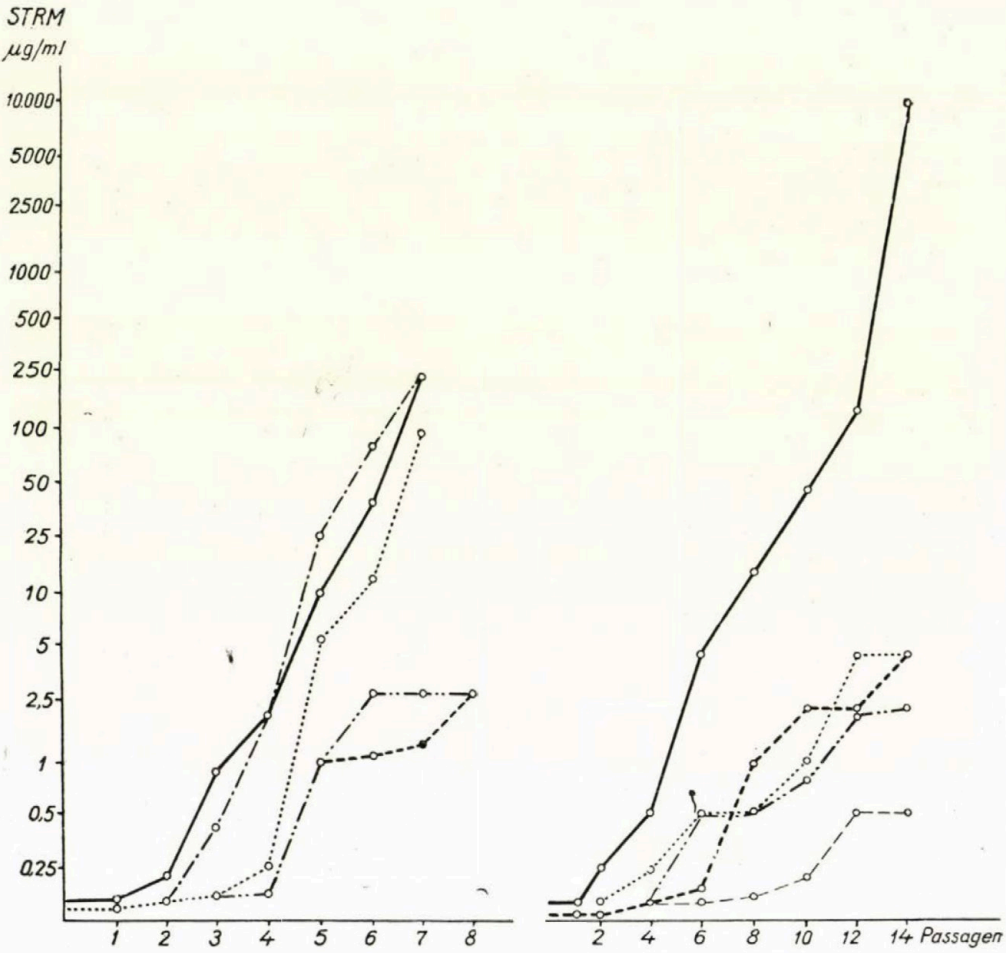


Abb. 3. Ausbildung der STRM-Resistenz auf verschiedenen Stickstoffquellen. Die Stickstoffquellen in für das Wachstum optimaler Dosierung. Passage des Stammes *M* nach jeweils 48 h, des Stammes *H* nach jeweils 24 h. Die sich auf den verschiedenen Stickstoffquellen und in den verschiedenen STRM-Konzentrationen zeigenden Wachstumsunterschiede wurden durch Überimpfung möglichst gleicher Zellenmengen — festgestellt auf Grund der Extinktionswerte — ausgeglichen

Stamm *M* Stamm *H*

Kaseinhydrolysat ——————
Ammoniumsulfat - - - - - - -
Histidin .....
Lysin . — . —
Asparaginsäure . — · · —
Glutaminsäure — — —

sich die Resistenz am schnellsten auf Kaseinhydrolysat aus, doch ergibt beim Stamme *M* das Lysin eine ebenso steile Kurve. Interessant dabei ist, dass dies gerade jene Aminosäure ist, die vom Stamme *H* überhaupt nicht verwertet wird (Tabelle II und III). Eine weit flachere Kurve zeigt sich auf Ammoniumsulfat, während es auf Asparaginsäure praktisch überhaupt nicht zur Resistenzbildung kommt.

Beim Stamme *H* bildet sich die Resistenz gleichfalls auf Kaseinhydrolysat am schnellsten aus. Eine ähnlich steile Kurve konnte auf keiner einzigen der untersuchten Aminosäuren erhalten werden. Die Ausbildung der Resistenz auf Ammoniumsulfat ist langsam, noch schlechter verläuft sie auf Asparaginsäure und Glutaminsäure.

TABELLE II

Unterschiedliche biochemische Eigenschaften des Stammes M und H

	Stamm *M*	Stamm *H*
Kolonietypus	nach 48 h stecknadelkopfgrosse, milchfarbige, fadenziehende Kolonien	nach 24 h glänzende, erhabene Kolonien von 2—3 mm ∅, nach 48 h solche von 4—6 mm ∅
Wachstum	langsam	schnell
Biotinanspruch	gross	—
Als einzige Stickstoffquelle *nicht* verwendbare Aminosäuren : (Kohlenhydratquelle: Glukose)	Glyzin, dl-Alanin, dl-Phenylalanin, dl-Leucin, dl-Norleucin, Glutaminsäure, dl-Serin, Zystin, Methionin, Threonin, Tryptophan	Lysin
Nicht verwertbare Kohlenhydratquellen (Stickstoffquelle : Kaseinhydrolysat)	Zitronensäure	—
Nicht verwertbare Kohlenhydratquellen (Stickstoffquelle : Ammoniumsulfat)	Zitronensäure, Ameisensäure, Weinsteinsäure, Oxalsäure, Äthanol	Ameisensäure, Weinsteinsäure, Essigsäure, Oxalsäure, Äthanol
STRM-Empfindlichkeit	0,2 µg/ml hemmt	0,2 µg/ml hemmt
PEN-Empfindlichkeit	5 µg/ml hemmt	15 µg/ml hemmt

Die Untersuchungen wurden auf der im «Methodischen Teil» angegebenen Grundnährlösung durchgeführt (nur bei der Bestimmung des Biotinanspruches wurde das Biotin weggelassen). Hierzu wurden die zu untersuchenden Stickstoff- bzw. Kohlenhydratquellen in dreierlei Konzentration hinzugefügt. Als nicht verwertbar wurden jene Quellen betrachtet, auf denen der Stamm *M* nach 140 h und der Stamm *H* nach 72 h keinerlei Wachstum zeigte.

Untersuchte Stickstoff- und Kohlenhydratquellen :

Glyzin, dl-Alanin, dl-Phenylalanin, l-Tyrosin, dl-Valin, dl-Norvalin, dl-Leucin, dl-Norleucin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, dl-Serin, Zystin, Methionin, Threonin, Prolin, Histidin, Tryptophan, l-Lysin, Ornithin, Zitrullin, L+Arginin, Harnstoff, Ammoniumsulfat.

Zitronensäure, Bernsteinsäure, Apfelsäure, Essigsäure, Milchsäure, Weinsteinsäure, Ameisensäure, Oxalsäure, Äthanol, Glyzerin.

TABELLE III

Verwertung einzelner Aminosäuren als einziger Stickstoffquellen durch den Stamm M und H

	Aminosäure	Stamm	
	Kaseinhydrolysat	*M*	*H*
	Histidin	*M*	*H*
	Asparaginsäure	*M*	*H*
	Glutaminsäure	(*M*)	*H*
	Lysin	*M*	
Gemisch Nr. 3	dl-Serin		*H*
	Threonin		*H*
	dl-Phenylalanin		*H*
	dl-Leucin		*H*
	Zystin		*H*

Der Stamm *H* verwertet nicht das vom Stamme *M* gut verwertbare Lysin, dagegen verwertet der Stamm *M* nicht dl-Serin, dl-Leucin, Threonin, Zystin, dl-Phenylalanin und deren Gemisch, die von Stamme *H* einzeln und auch gemeinsam verwertet werden.
Grundnährlösung s. im »Methodischen Teil«.

Indessen lässt sich auch beim Stamm *H* eine Resistenzausbildung erreichen, die der auf Kaseinhydrolysat fast gleichwertig ist, wenn mehrere Aminosäuren miteinander vermischt werden. Besonders interessant ist unter diesen das in den Versuchen mit Nr. 3 bezeichnete Aminosäurengemisch, das sich aus Aminosäuren zusammensetzt, die vom Stamme *M* nicht verwertet werden können (Tabelle III und Abb. 4).

Zur Erklärung der verschieden raschen Ausbildung der STRM-Resistenz auf den einzelnen Stickstoffquellen konnte die Vermutung herangezogen werden, dass in der N-Verwertung dieser resistent gewordenen Zellen Veränderungen eingetreten waren. Diesbezügliche Versuche ergaben jedoch, dass hinsichtlich der Stickstoffquellen-Verwertungsfähigkeit zwischen den auf den verschiedenen Stickstoffquellen entstandenen Varianten und dem Ausgangsstamme kein Unterschied besteht (Tabelle IV).

Besprechung der Ergebnisse

Im Laufe der Versuche wurde also eine Aminosäure (Lysin) gefunden, auf welcher der Stamm *M* unter den angewandten Versuchsverhältnissen eine optimale Resistenzausbildung zeigt und welche durch den Stamm *H* als alleinige Stickstoffquelle überhaupt nicht verwertbar ist. Des weiteren wurde auch ein

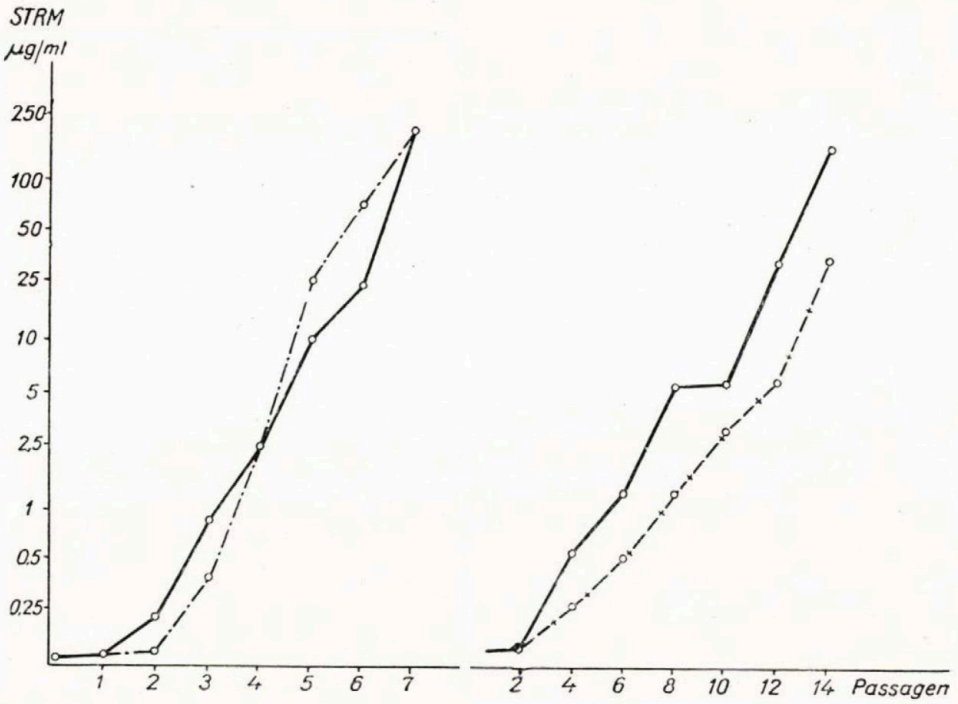


Abb. 4. Die optimale oder nahezu optimale Ausbildung der STRM-Resistenz auf einer durch den anderen Stamm nicht verwertbaren Stickstoffquelle

Siehe Text der Abb. 3.
Aminosäurengemisch Nr. 3: s. Tabelle III.

Stamm *M* Stamm *H*

Kaseinhydrolysat ——————
Lysin — · — · — · —
Aminosäurengemisch Nr. 3. — — + — —

Aminosäurengemisch gefunden (Gemisch Nr. 3), das vom Stamm *M* nicht verwertet werden kann, das aber beim Stamm *H* optimale Werte gibt. Die optimale Ausbildung der STRM-Resistenz wird also bei den beiden Stämmen durch jeweils andere Aminosäuren gefördert. Diese Feststellung eröffnete interessante methodische Möglichkeiten für spätere Untersuchungen (s. III. Teil). Die Resistenz der Varianten erwies sich selbst nach mehrmonatigen Passagen auf STRM-freiem Schrägagar als beständig, wovon nur die aus den niedrigsten Konzentrationen (0,5—2 µg/ml) isolierten Varianten eine Ausnahme bildeten. Zwar zeigten sich gewisse Schwankungen nach oben oder nach unten hin, doch blieben diese im allgemeinen innerhalb der Grenzen derselben Grössenordnung.

In ihrer im Jahre 1952 veröffentlichten Arbeit wiesen *Sevag* und *Rosanoff* [18] bei einem Stamm von E. coli eine ähnliche Rolle einzelner Amino-

TABELLE IV

Vergleich der Aminosäurenverwertung der Ausgangsstämme und der auf verschiedenen Stickstoffquellen ausgebildeten STRM-resistenten Varianten

	Adaptierter Ausgangsstamm					STRM-resistente Variante				
	M					M_R				
	Ammoniumsulfat	Asparaginsäure	Histidin	Lysin		Ammoniumsulfat	Asparaginsäure	Histidin	Lysin	
Ammoniumsulfat	200	150	150	200	—	140	140	140	160	
Asparaginsäure	200	140	140	160	—	140	140	140	130	
Histidin	140	140	140	160	—	150	140	140	160	
Lysin	150	140	180	160	—	120	140	140	110	
	H					H_R				
	Ammoniumsulfat	Asparaginsäure	Histidin	Glutaminsäure	Gemisch Nr. 3	Ammoniumsulfat	Asparaginsäure	Histidin	Glutaminsäure	Gemisch Nr. 3
Ammoniumsulfat	310	180	380	180	250	250	200	380	210	280
Asparaginsäure	310	180	320	220	240	300	200	380	270	260
Histidin	310	180	400	230	260	280	240	400	220	250
Lysin	310	180	320	220	220	250	200	290	200	280
Gemisch Nr. 3	310	170	380	200	260	280	180	400	240	290

Die Ausgangsstämme wurden vor der Untersuchung in 3 Passagen an die zu untersuchende Stickstoffquelle adaptiert.

Die angegebenen Werte sind die im *Lange*-Kolorimeter ermittelten Extinktionswerte (1000 × E), die beim Stamme *M* nach 72 h und beim Stamme *H* nach 48 h abgelesen wurden. Wesentliche Unterschiede bestehen nicht.

säuren nach. Auch dieser Coli-Stamm bildete auf Ammoniumsulfat keine STRM-Resistenz aus, doch verwerteten die auf verschiedenen Aminosäuren entstandenen Varianten das Ammoniumsulfat bereits gut.

Es ist bekannt, dass sich in der Frage der Ausbildung der Resistenz gegen Antibiotika zwei Auffassungen gegenüberstehen. Die eine sieht in ihr die Selektion spontan auftretender Mutanten [15]. Dagegen ziehen *Sevag* und *Rosanoff* aus dem Umstande, dass auf Ammoniumsulfat keine Varianten zustande kommen, die auf anderen Aminosäuren ausgebildeten Varianten sie jedoch gut verwerten, den Schluss, dass diese Erscheinung nicht mit einer Selektion spontaner Mutanten erklärt werden kann [18]. Gäbe es nämlich in der ursprünglichen Population bereits STRM-resistente Zellen, so könnte die Selektion auf Ammoniumsulfat ebenso erfolgen wie auf den als günstig befundenen Aminosäuren.

Unsere Versuche bestätigen den Standpunkt von *Sevag*. Die Erscheinung, dass sich die STRM-Resistenz auf einzelnen Stickstoffquellen nicht oder nur in einem geringen Ausmass ausbildet — obwohl die auf anderen Stickstoffquellen entstandenen Varianten auch diese Stickstoffquellen verwerten —, lässt sich

wohl nur dann in überzeugender Weise erklären, wenn man die Ausbildung der STRM-Resistenz als einen Adaptationsprozess auffasst.

Natürlich üben auf einen Adaptionsprozess nicht nur die Stickstoffquelle, sondern auch zahlreiche andere Faktoren einen wesentlichen Einfluss aus. So konnte von mehreren organischen Säuren nachgewiesen werden, dass sie die Ausbildung der Resistenz in unterschiedlicher Weise beeinflussen. Bei der Deutung dieser Versuche mahnt jedoch die bekannte, STRM inaktivierende Wirkung einiger organischer Säuren zur Vorsicht. B_1, B_6, B_x und B_{12} führten in Orientierungsversuchen zu keinen signifikanten Abweichungen. Aus diesem Grunde schien auch bei der gleichgerichteten Untersuchung der transformativen Veränderungen die Klarstellung der Rolle der Stickstoffquellen am zweckmässigsten zu sein.

B) *Die Ausbildung der Streptomycinresistenz unter Einwirkung streptomycinresistenter Zellsubstanzen*

Die im ersten Abschnitt geschilderten Transformationen wurden entweder zwischen Stämmen verschiedener Rhizobienarten oder zwischen verschiedenen Stämmen ein und derselben Art hervorgerufen. Um jedoch den Transformationsmechanismus mit dem eben geschilderten Adaptationsmechanismus in Gegenwart von STRM vergleichen zu können, waren Kombinationen erforderlich, bei denen sich die induzierende und die induzierte Komponente nur in einer einzigen Eigenschaft, in der Empfindlichkeit gegen Streptomycin unterscheiden, während die übrigen Eigenschaften, vornehmlich die Adaptationsansprüche in bezug auf die Stickstoffquellen, miteinander übereinstimmen. Deswegen wurde als induzierende Komponente die Zellsubstanz der aus dem in Abschnitt *A)* beschriebenen Versuchen als STRM-resistent hervorgegangenen Varianten verwendet und als zu induzierende Komponente die ursprünglichen STRM-empfindlichen Stämme.

Methodischer Teil

Versuchsmaterial:

Induzierende Komponenten:

Agarkulturen von Varianten des Stammes *M*, die bei 5, 10, 50, 100 bzw. 200 μg/ml STRM entstanden sind, wurden nach 48stündigem Wachstum abgespült. Diese Suspensionen wurden miteinander vermengt und das Gemisch im *Lange*-Kolorimeter auf E 0,1 eingestellt, nachher mit Ultraschall aufgeschlossen und mit Hitze behandelt. Bezeichnung: M_R *(Abb. 1)*

Ein ebenso behandeltes Gemisch der bei 10, 100 bzw. 1000 μg/ml STRM entstandenen. Varianten des Stammes *H* · Bezeichnung: H_R.

Als Kontrolle dienten die ebenso behandelten Suspensionen der Ausgangsstämme.

Induzierte Komponenten:

Suspensionen lebender Zellen der beiden Ausgangsstämme desselben Alters und dersel ben Dichte.

Transformation durch Ultraschallbehandlung :

Die Transformation durch Ultraschallbehandlung erfolgte nach dem im ersten Teil in *Abb. 1* dargestellten Verfahren. Das dort als «optimaler» Nährboden bezeichnete Medium wurde durch eine Nährlösung ersetzt, welche die verschiedenen zu untersuchenden Stickstoffquellen enthielt («Übergangsmedium»). Die sich ausbildenden Varianten wurden durch Überimpfung in Kaseinhydrolysat-Nährlösungen von verschiedener STRM-Konzentration nachgewiesen. Aus diesen Variantenpopulationen erfogte die Isolierung der einzelnen Varianten. Wo der Variantennachweis ein negatives Resultat zeitigte, wurde die Überimpfung aus dem Übergangsmedium in die STRM enthaltende Nährlösung wiederholt.

Transformation durch Penicillinbehandlung :

Die Transformation durch Behandlung mit Penicillin (PEN) wurde nach dem Prinzip von *Hotchkiss*[9] durchgeführt. Die Transformation erfolgte hierbei nicht zwischen der STRM-empfindlichen-Variante und dem Ausgangsstamm, sondern zwischen der STRM-resistenten und der PEN-resistenten Variante des Ausgangsstammes.

Die Anwendung dieser Methode geschah in zwei Modifikationen :

a) *Gemeinsame Züchtung der beiden Komponenten im PEN-haltigen Medium.* Diese Modifikation wurde beim Stamm *M* angewandt.

Zuerst wurde in Vorversuchen festgestellt, dass die Varianten des Gemisches M_R gegen 5 μg/ml PEN empfindlich sind und dass sich der Abstand zwischen der bakteriostatischen und bakteriziden Wirkung in engen Grenzen bewegt. Ferner wurde festgestellt, dass die mikroskopisch kontrollierbare Lysis der Zellen in Gegenwart von 10 μg/ml PEN vollständig ist (Zellendichte : E : 0,1).

Danach wurden auf Kaseinhydrolysat aus dem Ausgangsstamm in Gegenwart steigender PEN-Konzentrationen Varianten gezüchtet, die 100 μg/ml PEN gegenüber resistent waren.

Ferner wurde festgestellt, dass die PEN-resistente Variante gegen 0,2 μg/ml STRM empfindlich blieb und die untersuchten Stickstoffquellen ebenso verwertete wie der ursprüngliche Stamm.

Im Hauptversuch wurden für jede Stickstoffquelle je 10 Röhrchen eingestellt, u. zw. mit je 2 ml Nährlösung und je 0,2 ml einer 48stündigen M_R-Suspension (E : 0,1).

Das erste Röhrchen wurde mit M_{PEN} 100 geimpft und nach Zugabe von 10 μg/ml PEN bei 25°C inkubiert. Die übrigen Röhrchen wurden mittlerweile im Eisschrank gehalten. Nach 48 Stunden wurde eine Überimpfung des Inhaltes des ersten Röhrchens in das zweite Röhrchen vorgenommen, wobei gleich viel PEN zugegeben wurde. Dies wurde so bis zur 10. Passage fortgesetzt.

Die in den einzelnen Passagen auftretenden Varianten wurden in STRM- und kaseinhydrolysathaltiger Nährlösung selektiert.

b) *Vorangehende Aufschliessung der induzierenden Komponente in PEN-haltigem Nährboden.* Diese Modifikation wurde beim Stamm *H* angewandt, bei dem nur hohe PEN-Konzentrationen eine bakterizide Wirkung hatten. Aus diesem Grunde kam die gemeinsame Züchtung in einem PEN-haltigen Medium nicht in Betracht.

Der Nährlösung mit der zu untersuchenden Stickstoffquelle wurden 0,2 ml H_R-Gemisch (E : 0,1) und 100 μg/ml PEN je Röhrchen zugesetzt. Alle 10 Röhrchen wurden 24 Stunden lang inkubiert. Eine mikroskopisch wahrnehmbare Lysis wurde nur bei einzelnen Zellen beobachtet. Die Zellen wurden in allen 10 Röhrchen durch Hitze abgetötet (1 Stunde bei 70°C), wodurch gleichzeitig auch das Penicillin teilweise inaktiviert wurde. Das erste Röhrchen wurde nun mit $H_{PEN}250$ beimpft. Nach 24stündigem Inkubieren erfolgte die Überimpfung in das nächste Röhrchen, und so fort bis zur 10. Passage. Die entstandenen Varianten wurden auch hier in STRM-haltigem Nährboden selektiert.

Nährlösungen :

«Optimale» Nährlösung s. unter «Methodischer Teil» im I. Teil dieser Abhandlung. Sämtliche übrigen Nährlösungen und Stickstoffquellen-Konzentrationen siehe unter «Methodischer Teil» im Abschnitt *A)* des II. Teils.

Bezeichnungen :

M und *H* :	Ausgangsstämme,
M_R und H_R :	Gemisch von Varianten, die sich bei verschiedenen STRM-Konzentrationen ausgebildet haben,
M_R und H_R :	aufgeschlossene und abgetötete Zellen desselben Variantengemisches,
M_{PEN} und H_{PEN} :	PEN-resistente Varianten.

Bezeichnung der Kombinationen: vor dem Pfeil induzierende Komponente, nach dem Pfeil induzierte Komponente (z. B.: $\boldsymbol{H}_R \rightarrow H$).

Experimenteller Teil

Es wurde von der Beobachtung ausgegangen, dass sich bei der Ausbildung der STRM-Resistenz auf transformativem Wege — also in Abwesenheit von STRM — zwei Phasen unterscheiden lassen, nämlich eine absorbative Phase und eine zweite Phase, in welcher die eigentliche Variantenbildung vor sich geht und in welcher eine oder mehrere Aminosäuren des Kaseinhydrolysats eine bedeutende Rolle spielen.

Dies war auch bei der durch STRM bewirkten Ausbildung der Resistenz der Fall und dort konnten wir die Rolle einzelner Aminosäuren bereits gesondert untersuchen. Da unser Ziel der Vergleich der beiden Mechanismen war, wurden auch beim Transformationsvorgang dieselben Stickstoffquellen eingesetzt und noch durch eine nicht verwertbare Stickstoffquelle — auf der also die Zellen im Ruhezustand verbleiben — ergänzt. Zu diesem Zwecke verwendeten wir aus Gründen, auf die wir im III. Teil zurückkommen, für jeden der beiden Stämme jene Stickstoffquelle, auf welcher der andere Stamm unter STRM-Einwirkung eine optimale Resistenzausbildung zeigte.

Die diesbezüglichen Ergebisse sind in Tabelle V zusammengestellt.

Ohne die Einschaltung des Übergangsmediums bilden sich auf Kaseinhydrolysat + STRM keine Varianten aus.

Während der Lag-Phase entstehen auf Kaseinhydrolysat noch keine Varianten.

In der logarithmischen Phase bildeten sich bei beiden Stämmen Varianten auf Kaseinhydrolysat und auf jenen Stickstoffquellen, auf denen die Ausbildung der Resistenz auch unter STRM-Einwirkung am günstigsten verlief. In keiner der beiden Kombinationen bildeten sich Varianten auf jener Stickstoffqeuelle, auf welcher sich auch unter STRM-Einwirkung keine Resistenz ausbildete. Ebenso bildeten sich auch auf den nicht verwertbaren Stickstoffquellen keine Varianten. In den Kontrollen — Ausgangsstamm allein behandelt — bildeten sich gleichfalls keine Varianten.

Die Resistenz der Varianten ist sehr gering (0,5—2,0 μg/ml). Dies ist überraschend, da sich ja die induzierende Komponente aus Zellen zusammensetzte, die gegen 10, 100, 200 usw. μg/ml STRM resistent waren.

Das Ultraschallverfahren wurde deshalb angewandt, weil es zu sehr raschen und immer reproduzierbaren Ergebnissen führte. Später war es dieses Verfahren, das eine Trennung der zwei Phasen des Transformationsprozesses ermöglichte, was bei Passagezüchtungen undurchführbar ist. Nichtsdestoweniger wurde der Versuch gemacht, die obigen Feststellungen auch mit einer der üblichen Passa-

TABELLE V

Ultraschalltransformation zwischen den STRM-resistenten Varianten und der Ausgangsform ein und desselben Stammes

Übergangsnährlösung	Wachstum nach	Varianten auf µg/ml STRM	Wachstum nach	Varianten auf µg/ml STRM
	$M_R \rightarrow M$		$M \rightarrow M$ (Kontrolle)	
	96 h		96 h	
Kaseinhydrolysat	*	—	*	—
Kaseinhydrolysat	+	1	+	—
Kaseinhydrolysat + 1 µg/ml STRM	—	—	—	—
Lysin	+	1	+	—
Ammoniumsulfat	+	0,5	+	—
Asparaginsäure	+	—	+	—
Gemisch Nr. 3	—	—	—	—
	$H \rightarrow H$		$H \rightarrow H$ (Kontrolle)	
	72 h		72 h	
Kaseinhydrolysat	*	—	*	—
Kaseinhydrolysat	+	2	+	—
Kaseinhydrolysat + 1 µg/ml STRM	—	—	—	—
Gemisch Nr. 3	+	1	+	—
Ammoniumsulfat	+	—	+	—
Glutaminsäure	+	—	+	—
Lysin	—	—	—	—

Bezeichnung der Kombinationen: vor dem Pfeil induzierende, nach dem Pfeil: induzierte Komponente
Fett gedruckt: aufgeschlossene und abgetötete Zellsubstanz.

Das mit Ultraschall behandelte Material wurde unmittelbar nach der Bestrahlung in die Übergangsnährlösungen verteilt. Die Überimpfung in 0,5—1—2—5 µg/ml Kaseinhydrolysat enthaltende Medien erfolgte beim Stamme *M* nach 96 h, beim Stamme *H* nach 72 h. Eine Ausnahme bildeten nur die mit * bezeichneten Proben, von denen die Überimpfung während der Lag-Phase vorgenommen wurde (beim Stamme *M* nach 20 h, beim Stamme *H* nach 6 h).

Die angegebenen Werte zeigen diejenige höchste STRM-Konzentration, bei der sich noch Varianten bildeten.

Die Absterbekontrollen der induzierenden Komponenten M_R und H_R (Tabelle I, Kontrolle Nr. 2) sind hier nicht angeführt.

geverfahren zu überprüfen, u. zw. durch Züchtung auf Autolysaten oder auf mit Ultraschall aufgeschlossener Zellsubstanz.

Die Ergebnisse dieser Versuche bestätigten in allem die mit Ultraschalltransformation erhaltenen Resultate, obwohl die Varianten — wie dies schon seinerzeit beobachtet wurde — erst nach mehreren, häufig sogar erst nach sehr zahlreichen Passagen auftraten und in einzelnen Versuchsreihen Ausfälle zu verzeichnen waren.

Sehr gute Ergebnisse wurden hingegen mit einem Verfahren erzielt, das auf einer in ihren Einzelheiten uns nicht zugänglichen Methode von *Hotchkiss* beruht und das hier kurz PEN-Transformation genannt werden soll. *Hotchkiss* [9] gelang es, in einem PEN-haltigen Medium, in welchem die sich teilenden PEN-empfindlichen Zellen zerfallen, zwischen PEN-resistenten und PEN-empfindlichen Pneumokokken Transformationen hervorzurufen. Der grosse Vorteil der PEN-Transformation liegt darin, dass die Zellen gerade im Teilungszustand — also in dem für die Transformation wahrscheinlich günstigsten Zustand — aufgeschlossen werden und dass der wirksame Stoff unmittelbar auf Zellen der gleichen Entwicklungsstufe übertragen wird.

Das Verfahren von *Hotchkiss* wurde in zwei Modifikationen weiter ausgebaut.

a) Aus dem ursprünglichen Stamm wurden PEN-resistente Varianten ausgebildet und die Transformation nicht in den Kombinationen $\boldsymbol{H}_R \rightarrow H$ und $\boldsymbol{M}_R \rightarrow M$, sondern $\boldsymbol{H}_R \rightarrow H_{PEN}$ und $\boldsymbol{M}_R \rightarrow M_{PEN}$ durchgeführt. Beim Stamme *M* war eine gemeinsame Züchtung der beiden Komponenten möglich (siehe Modifikation *a)* unter «Methodischer Teil»). Beim Stamme *H* wurde das Verfahren in der Modifikation *b)* durchgeführt. Die Versuchsergebnisse sind aus Tabella VI ersichtlich.

TABELLE VI

Transformation im PEN-haltigen Medium zwischen den STRM-resistenten, aber PEN-empfindlichen und den STRM-empfindlichen, aber PEN-resistenten Varianten ein und desselben Stammes

Stickstoffquelle der Nährlösung	Passage 1	2	4	6	8	10	Passage 1	2	4	6	8	10
	$\boldsymbol{M}_R \rightarrow M_{PEN}$						$\boldsymbol{M} \rightarrow M_{PEN}$ (Kontrolle)					
Kaseinhydrolysat	0,5	1	1	1	3	3	—	—	—	—	—	—
Lysin	—	1	1	1	2	2	—	—	—	—	—	—
Ammoniumsulfat	—	—	—	—	0,5	0,5	—	—	—	—	—	—
Asparaginsäure	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	$\boldsymbol{H}_R \rightarrow H_{PEN}$						$\boldsymbol{H} \rightarrow H_{PEN}$ (Kontrolle)					
Kaseinhydrolysat	—	—	0,5	1	2	2	—	—	—	—	—	—
Gemisch Nr. 3	—	—	—	0,5	0,5	0,5	—	—	—	—	—	—
Ammoniumsulfat	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Glutaminsäure	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Die Passagen erfolgten bein Stamme *M* nach jeweils 48 h, beim Stamme *H* nach jeweils 24 h. Die Wachstumsunterschiede wurden auf Grund der im *Lange*-Kolorimeter ermittelten Extinktionswerte durch die Menge der überimpften Zellen ausgeglichen. Der Nachweis der Variantenbildung geschah in einem kaseinhydrolysathaltigen Medium, das STRM in einer Konzentration von 0,5, 1, 2, 3 bzw. 5 μg/ml enthielt.

Die angegebenen Werte zeigen diejenige höchste STRM-Konzentration, bei der noch ein Wachstum zu beobachten war.

In der Kombination $M_R \rightarrow M_{PEN}$ liessen sich auf Kaseinhydrolysat bzw. Lysin bereits nach einer bzw. zwei Passagen Varianten selektieren. Auf Ammoniumsulfat kam es erst viel später und auf Asparaginsäure während 10 Passagen überhaupt nicht zur Bildung von Varianten.

In der Kombination $H_R \rightarrow H_{PEN}$ waren die Versuchsverhältnisse etwas weniger günstig, da der Stamm *H* unter der Einwirkung von PEN nur eine geringe Lysis zeigt und so nur wenige Zellen aufgeschlossen werden können. Doch selbst in diesem Falle erschienen nach 4 bzw. 6. Passagen Varianten auf Kaseinhydrolysat bzw. auf Gemisch Nr. 3, wogegen auf Ammoniumsulfat und Glutaminsäure innerhalb von 10 Passagen noch keine Variantenbildung wahrzunehmen war. Die Resistenz der ersten sich bildenden Varianten ist noch niedriger als bei den Ultraschalltransformationen, steigt dann langsam an, erreicht jedoch niemals einen höheren Wert als 3 μg/ml.

Besprechung der Ergebnisse

Aus den gewonnenen Angaben können mehrere Folgerungen gezogen werden :

1. Als das mit Ultraschall bestrahlte Material auf die einzelnen Nährlösungen verteilt wurde, war die Adsorption des fremden Zellenmaterials bereits erfolgt.

2. Zu diesem Zeiptunkt hatten sich noch keine Varianten ausgebildet (sonst hätten sie sich nämlich im STRM-haltigen Medium unmittelbar vermehrt).

3. Die Varianten bildeten sich nur auf gewissen Stickstoffquellen aus.

4. Zur Variantenbildung eignen sich wahrscheinlich nur sich teilende Zellen. Jedenfalls ist für diesen Vorgang eine bestimmte Zeitspanne notwendig.

Die zweite Phase der Transformation ist demnach ein Adaptationsprozess und verläuft als solcher nur unter Adaptationsbedingungen, die für den Ausgangsorganismus günstig sind. Hierdurch wird auch der scheinbare Widerspruch erklärt, dass STRM-resistente Varianten in Gegenwart von STRM nicht zustande kommen.

Es entsteht nun die Frage, ob auch andere transformative Umwandlungen von denselben Adaptationsbedingungen abhängen wie die Ausbildung der Resistenz gegenüber STRM. Eine Antwort hierauf wird erst nach Vornahme gleichartiger Untersuchungen anderer transformativer Erscheinungen (z. B. Verwertung neuer Stickstoff- oder Kohlenhydratquellen, Veränderung des Biotinanspruches) möglich sein.

Die hier beschriebenen Versuche führen diesbezüglich zu einer Auffassung, die im Widerspruch zu jener von *Gratschewa* [8] und von *Timakow* [22] steht. Nach den Erfahrungen dieser Forscher spielen sich nämlich die transformativen Prozesse am erfolgreichsten auf Hungernährböden ab. Die zur Verfügung stehenden Angaben gewähren leider keine Möglichkeit, ihre Versuche genauer zu

analysieren. Möglicherweise handelt es sich nur um scheinbare Widersprüche, indem diese Hungernährböden entweder an für den Adaptationsprozess nicht essentiellen Faktoren defizient sind, oder aber spielen sie erst nach Ablauf dieses Prozesses eine selektive Rolle.

Eine weitere interessante Feststellung bietet die auffallende Parallelität des Verhaltens auf den untersuchten Stickstoffquellen, einerlei ob sich die Resistenz unter Einwirkung von STRM oder von STRM-resistenter Zellsubstanz ausbildet.

Die Ausbildung der Resistenz infolge STRM-Einwirkung ist, wie oben ausgeführt, ein im weiteren Sinne des Wortes substratbedingter Adaptationsprozess.

Die Ausbildung der Resistenz infolge Einwirkung STRM-resistenter Zellsubstanz ist, wie eben festgestellt wurde, in ihrer zweiten Phase gleichfalls ein Adaptationsprozess, der durch fremde DNS ausgelöst wird.

Jeder Adaptationsprozess kann als Synthese eines neuen Nukleoproteids aufgefasst werden. Demzufolge wäre die Rolle der untersuchten Stickstoffquellen in der Synthese des Proteinteils der Nukleoproteide zu suchen.

Diese beiden Mechanismen der Resistenzausbildung dienten uns als Modelle von Veränderungen, die auf Einwirkung von Umweltfaktoren bzw. au Einwirkung von Zellsubstanz abweichender genetischer Zusammensetzung zustande kommen. Innerhalb des Rahmens unserer Versuche wurde zwischen diesen beiden grundlegenden biologischen Prozessen eine wesentliche Übereinstimmung festgestellt. Worauf die niedrige Resistenz der sich bildenden Varianten zurückzuführen ist, bleibt vorderhand ungeklärt.

Zusammenfassung des II. Teils

Bei zwei Rhizobiumstämmen von verschiedenem Stoffwechseltypus wurden einzelne Bedingungen der Resistenzausbildung miteinander verglichen, u. zw. A.) unter unmittelbarer STRM-Einwirkung und B) unter Einwirkung von STRM-resistenter Zellsubstanz.

Letzteres ist ein Prozess, bei welchem sich zwei Phasen unterscheiden lassen. In der ersten Phase adsorbiert der umzugestaltende Organismus den fremden wirksamen Stoff. Diese Phase führt noch nicht zur Ausbildung von Varianten. Die zweite Phase stellt einen Adaptationsvorgang dar, in dem die untersuchten Stickstoffquellen dieselbe Rolle spielen wie bei der Ausbildung der Resistenz infolge unmittelbarer STRM-Einwirkung. Dies deutet auf eine wesentliche Übereinstimmung der beiden Prozesse hin.

III. Die transformative Ausbildung der Streptomycinresistenz zwischen zwei Rhizobienarten

Die bisherigen, hier geschilderten Untersuchungen hatten zur Feststellung geführt, dass die STRM-Resistenz nur dann transformierbar ist, wenn die

Adaptationsansprüche des Organismus befriedigt werden. In den bisher untersuchten Kombinationen gehörten beide Komponenten demselben Stamme an und unterschieden sich lediglich in einer einzigen Eigenschaft, nämlich der STRM-Resistenz der als induzierende Komponente eingesetzten Varianten. Ihre Adaptationsansprüche waren demnach naturgemäss identisch.

Anders verhält es sich, wenn die Transformation zwischen zwei Stämmen verschiedener Arten durchgeführt wird. Die untersuchten Adaptationsbedingungen unserer beiden Versuchsstämme *H* und *M* waren verschieden (Abb. 3 und Tabelle V), wobei beide Stämme überdies zur Variantenbildung gerade jene Stickstoffquelle bevorzugten, die vom anderen Stamm überhaupt nicht verwertet wurde (Abb. 4 und Tabelle III).

Welche sind nun die Komponenten, deren Adaptationsbestimmungen sicherzustellen sind? In Kombinationen zwischen diesen beiden Stämmen lässt sich diese Frage *in extremis* aufwerfen.

Vier Möglichkeiten sind hierbei in Erwägung zu ziehen :

1. Es sind die Adaptationsbedingungen der induzierten Komponente sicherzustellen, da dies der variierende Organismus ist.

2. Es sind die Adaptationsbedingungen der induzierenden Komponente sicherzustellen, weil sich der Stoffwechseltypus der sich ausbildenden Varianten in ihrer Richtung modifiziert.

3. Es sind die Adaptationsbedingungen beider Komponenten zu befriedigen.

4. Die Variantenbildung geht unabhängig von diesen Adaptationsbedingungen vor sich.

Methodischer Teil

Versuchsmaterial :

Zwischen den Ausgangsstämmen *H* und *M* wurden in der Kombination $\boldsymbol{H} \rightarrow M$ bereits verschiedene Transformationserscheinungen nachgewiesen[5]. Aus diesem Grunde erschien es wahrscheinlich, dass auch in den Kombinationen $\boldsymbol{H}_R \rightarrow M$ und $\boldsymbol{M}_R \rightarrow H$, also bei Induktion durch die STRM-resistenten Varianten der Stämme, Transformationen zustande kommen. Obwohl sich unsere Versuche nur auf die Untersuchung der transformativen Übertragung der STRM-Resistenz erstreckten, boten die scharfen Unterschiede in bezug auf den Stoffwechseltypus der beiden Stämme (Tabelle II) die Möglichkeit, auch andere Veränderungen der entstandenen Varianten nachzuweisen.

Transformationsverfahren :

Die Versuche wurden mit dem Ultraschalltransformationsverfahren in den Kombinationen $\boldsymbol{H}_R \rightarrow M$ und $\boldsymbol{M}_R \rightarrow H$ und mit dem PEN-Verfahren in der Kombination $\boldsymbol{M}_R \rightarrow H_{PEN}$ ausgeführt, u. zw. letzteres Verfahren unter gemeinsamer Züchtung in PEN-haltigem Medium auf die bereits geschilderte Weise.

Sämtliche Suspensionen (sowohl die induzierende wie die induzierte Komponente) waren mit den im II. Teil benutzten Suspensionen identisch, somit waren jene Kombinationen $\boldsymbol{M}_R \rightarrow M$ und $\boldsymbol{H}_R \rightarrow H$ gleichzeitig auch Kontrollen der neuen Kombinationen. In den Abbildungen werden sie nicht nochmals angegeben. Als weitere Kontrollen dienten die Kombinationen $\boldsymbol{H} \rightarrow M$ und $\boldsymbol{M} \rightarrow H$ der Ausgangsstämme.

Experimenteller Teil

Kombination $M_R \rightarrow H$ (Tabelle VII) :

TABELLE VII

Ultraschalltransformation zwischen zwei Arten (Siehe auch Text von Tabelle V)

Übergangsnährlösung	Wachstum nach	Varianten auf µg/ml STRM	Wachstum nach	Varianten auf µg/ml STRM
	$M_R \rightarrow H$		$M \rightarrow H$ (Kontrolle)	
	72 h		72 h	
Kaseinhydrolysat	+	2	+	—
Kaseinhydrolysat + 1 µg/ml STRM	+	1	—	—
Lysin	+	5	+	—
Gemisch Nr. 3	+	1	+	—
Lysin + Gemisch Nr. 3	+	2	+	—
	$H_R \rightarrow M$		$H \rightarrow M$ (Kontrolle)	
	96 h		96 h	
Kaseinhydrolysat	+	0,5	+	—
Kaseinhydrolysat + 1 µg/ml STRM	+	1	—	—
Lysin	+	0,5 (±)	+	—
Gemisch Nr. 3	+	5	—	—
Lysin + Gemisch Nr. 3	+	0,5	+	—

Im Ultraschalltransformationsverfahren bildeten sich STRM-resistente Varianten aus :

a) auf Kaseinhydrolysat und auf Lysin + Gemisch Nr. 3, also auf jenen Stickstoffquellen, welche sowohl für den Stamm *H* als auch für den Stamm *M* günstige Adaptationsbedingungen gewährleisten ;

b) auf Gemisch Nr. 3, also auf jener Stickstoffquelle, welche die Adaptationsmöglichkeit für die induzierte Komponente erschliesst;

c) auf Lysin, also auf jener Stickstoffquelle, welche vom induzierten Organismus überhaupt nicht verwertet wird und welche für die Adaptation des induzierenden Organismus günstig ist ;

d) die Variantenbildung trat auch ein, wenn das mit Ultraschall behandelte Material unmittelbar nach der Ultraschallbestrahlung *auf Kaseinhydrolysat + STRM* gebracht wurde.

Kombination $H_R \rightarrow M$ (Tabelle VII):

Variantenbildung erfolgte:

a) auf Kaseinhydrolysat und auf Lysin + Gemisch Nr. 3, also auf jenen Stickstoffquellen, die für beide Stämme günstig sind;

b) ebenso *auf Gemisch Nr. 3*, also auf einer für den induzierenden Stamm günstigen Stickstoffquelle, die vom induzierten Organismus nicht verwertet wird;

c) erfolgte nicht *auf Lysin*, das vom induzierenden Organismus nicht verwertet wird, für den induzierten dagegen günstig ist;

d) bei unmittelbarer Überimpfung des mit Ultraschall behandelten Materials kam es *auf Kaseinhydrolysat + STRM* zur Variantenbildung.

Diese Feststellungen konnten mit keiner unserer Annahmen in Einklang gebracht werden. Sie weisen nicht nur im Vergleich der beiden Kombinationen Widersprüche auf, sondern stehen auch im Gegensatz zu den Schlüssen, die wir aus den im II. Teil der vorliegenden Abhandlung geschilderten Erfahrungen zogen, dass nämlich die Ausbildung von Varianten von der Erfüllung von Adaptationsbedingungen abhängig ist. Es lassen sich aus ihnen auch keine Schlüsse anderer Art ziehen.

Eine merkwürdige Abweichung von den Transformationen innerhalb desselben Stammes bedeutet auch, dass ein Teil der Varianten der höchsten untersuchten STRM-Konzentration gegenüber (5 μg/ml) resistent war. (Die nachträgliche Untersuchung der aus diesen Konzentrationsstufen isolierten Varianten zeigte eine Resistenz von 50—100 μg/ml.)

Hier lässt sich allerdings bereits insofern eine gewisse Gesetzmässigkeit feststellen, als Varianten von grösserer Resistenz *nicht* auf jenen Stickstoffquellen entstanden, welche *nur* für den induzierten Organismus günstig sind.

Zu einer möglichen Erklärung dieser sich widersprechenden Beobachtungen führte die Bestimmung der Kolonietypen der verschiedenen Varianten.

Die Kolonien der beiden Stämme zeigen — wie aus Tabelle II ersichtlich — charakteristische Unterschiede.

Selektierten wir die in den verschiedenen Nährlösungen entstandenen Variantenpopulationen auf Kaseinhydrolysat + STRM, so verteilten sich die beiden Kolonietypen nach Tabelle VIII.

Intermediäre Kolonietypen fanden wir nicht.

Kolonien vom Typus des induzierten Organismus bilden sich in der Kombination $M_R \rightarrow H_R$ (also Kolonien vom Typus *H)* unter jenen Adaptationsbedingungen, die wir aus den Kombinationen innerhalb desselben Stammes (in diesem Falle $H_R \rightarrow H$, Tab. V) schon kennen.

In der Kombination $H_R \rightarrow M$ entstanden Varianten vom Typus des induzierten Organismus (Typus *M)* überhaupt nicht.

Dagegen bilden sich in beiden Kombinationen Varianten vom Kolonietypus des induzierenden Organismus aus, doch nur auf Stickstoffquellen, die vom

TABELLE VIII

Kolonietypen von Populationen STRM-resistenter Varianten

	Übergangsnährlösung	Kolonietypus der STRM-resistenten Variantenpopulation	
$M_R \rightarrow H$	Kaseinhydrolysat	*M*	*H*
	Lysin	*M*	—
	Gemisch Nr. 3	(*M*)	*H*
	Lysin + Gemisch Nr. 3	*M*	*H*
	Kaseinhydrolysat + 1 µg/ml STRM	*M*	—
$H_R \rightarrow M$	Kaseinhydrolysat		*H*
	Lysin		—
	Gemisch Nr. 3		*H*
	Lysin + Gemisch Nr. 3		*H*
	Kaseinhydrolysat + 1 µg/ml STRM		*H*

Die Platten wurden aus den 0,5 µg/ml STRM enthaltenden Proben gegossen.
(*M*): nur vereinzelte Kolonien.

induzierenden Organismus verwertet werden können. Es spricht nichts dafür, dass sie einen Adaptationsprozess benötigen. (Sie entwickeln sich unmittelbar in STRM-haltigem Medium ohne Zwischenschaltung einer Adaptationsphase.) Die verwertbaren Stickstoffquellen haben nur eine selektive Rolle. Diese Varianten sind es, die über eine höhere Resistenz verfügen.

Von der Kombination $M_R \rightarrow H$ wurden je zwei Varianten vom Typus *H* und je zwei vom Typus *M* und von der Kombination $H_R \rightarrow M$ zwei Varianten vom Typus *H* eingehender untersucht. Sie wurden mit den Ausgangsstämmen vom Gesichtspunkt aller jener Stoffwechseleigenschaften verglichen Tabelle II), in denen sich die beiden Stämme unterscheiden.

Abgesehen von einigen nicht charakteristischen Abweichungen stimmten die Varianten vom Typus *M* hinsichtlich jeder untersuchten Eigenschaft mit dem Stamm *M* und die Varianten vom Typus *H* mit dem Stamm *H* überein.

In der Kombination $M_R \rightarrow H_{PEN}$ konnten beide Kolonietypen auch mit der PEN-Methode nachgewiesen werden. Die Kombination $H_R \rightarrow M_{PEN}$ lässt sich mit dem PEN-Verfahren nicht einstellen.

Besprechung der Ergebnisse

Es unterliegt keinem Zweifel, dass die auf zweierlei Art vor sich gehende Ausbildung der Varianten das Ergebnis zweier verschiedener Mechanismen ist.

Nach der Einteilung *Kalinas* gehört der eine Mechanismus offensichtlich in jene Gruppe, in der sich die Arteigenschaften nicht verändern. Dies war in den Kombinationen innerhalb desselben Stammes sowie in der Kombination $M_R \rightarrow H$ zwischen verschiedenen Arten der Fall. Dieser Mechanismus weist einen adaptiven Charakter auf.

Der andere Mechanismus ist in die 2. Gruppe *Kalinas* einzureihen. Die entstehenden Varianten zeigen neue Arteigenschaften. Dieser ist nur in den Kombinationen zwischen verschiedenen Arten anzutreffen. (In den Kombinationen innerhalb derselben Art hätte er unmittelbar auf STRM-haltigem Medium zum Ausdruck kommen müssen.) Dieser Mechanismus stellt keinen Adaptationsprozess dar. Über seine Bedingungen ist nichts bekannt.

In unseren Versuchen war der wirksame Stoff in Form von aufgeschlossener und mit Hitze abgetöteter Zellsubstanz anwesend. Es ist also Tatsache, dass dieser über eine gewisse Hitzeresistenz verfügende Stoff den ganzen Stoffwechseltypus des induzierenden Organismus umgestaltet. Solche Erscheinungen sind in der Problematik der Viren und filtrierbaren Formen nicht unbekannt.

Mit den Beziehungen zwischen Transformationserscheinungen und filtrierbaren Formen haben sich bereits mehrere Forscher befasst. *Silber* [20] und *Gratschewa* [8] beobachteten, dass die sogenannten primären Kolonien der filtrierbaren Formen stets im Umkreis der Kolonien der «Parastämme» (transformierte Stämme) erscheinen. Gemäss ihrer Auffassung müsste man also die hier geschilderte Erscheinung so erklären, dass sich die filtrierbare Form des einen Organismus auf fremder lebender Substanz regeneriert hat. An Hand der Salmonella-Transduktionen *Lederbergs* taucht ebenfalls die Möglichkeit der Gegenwart filtrierbarer Formen auf [13]. *Klieneberger-Nobel* berichten über die grössere Hitzeresistenz der filtrierbaren Formen [11].

Als Hypothese könnte demnach auch die Vorstellung in Betracht kommen, dass Veränderungen adaptiver Natur, welche die Grenzen der Art nicht überschreiten, durch Desoxyribonukleinsäuren und Veränderungen, die mit Artumgestaltung einhergehen, durch Nukleoproteide hervorgerufen wurden, welche gewisse Eigenschaften der lebenden Substanz besitzen. Der Beweis für diese Hypothese geht jedoch über den Rahmen der vorliegenden Abhandlung hinaus.

Von Interesse ist, dass jene Varianten, die eingehender untersucht wurden, nicht nur in bezug auf ihren Kolonietypus, sondern auch in anderen Stoffwechseleigenschaften keine Zwischenformen aufwiesen. Dies scheint die Annahme zu bestätigen, dass sich überhaupt keine Zwischenformen auszubilden vermögen, weil jede Veränderung entweder eine Variabilität innerhalb der gleichen Art oder eine sprunghafte Umwandlung in eine andere Art darstellt. Die im I. Teil geschilderten Versuche mahnen aber diesbezüglich zur Vorsicht. Die Transformationen zwischen den verschiedenen Rhizobienarten wurden nämlich dort nicht nur an Hand der Ausbildung von STRM-Resistenz nachgewiesen,

sondern es wurden auch auf Grund anderer Veränderungen Varianten selektiert, von denen sehr viele intermediäre Stoffwechseltypen aufwiesen.

Zusammenfassung des III. Teils

Bei der Untersuchung der Transformation der STRM-Resistenz zwischen verschiedenen Arten war es möglich, zwei Transformationstypen zu unterscheiden. Zur Klärung des Mechanismus des einen Typus konnte insofern ein Beitrag geleistet werden, als dieser auf Grund der Versuchsergebnisse nunmehr als Adaptationsprozess aufgefasst werden kann. Der Mechanismus des anderen Transformationstypus ist noch völlig ungeklärt.

Es sei hier dem Leiter unseres Institutes, *B. Györffy* für seine Unterstützung und Frau *I. Góth* für ihre technische Hilfe der beste Dank ausgesprochen.

LITERATUR

1. *Alexander, H.—Leidy, G.:* J. Exp. Med. **93,** 345 (1951).
2. *Alloway, J.:* J. Exp. Med. **57,** 265 (1933).
3. *Austrian, R.—Macleod, C. M.:* J. Exp. Med. **89,** 451 (1949).
4. *Avery, O. T.—Macleod, C. M.—McCarty, M.:* J. Exp. Med. **79,** 137 (1944).
5. *Balassa, R.:* MTA Agrártud. Osztályközl. II, 307 (1953).
6. *Boivin, A.:* Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. **12,** 7 (1947).
7. *Coleman, M.—Reid, J.:* Phytopathology **39,** 182 (1949).
8. *Грачева, П.Н.:* Агробиология, 3, 1946.
9. *Hotchkiss, R. D.:* Cold Spring Hrb. Symp. Quant. Bio. **16,** 457 (1951).
10. *Калина, Г. П.:* Медгиз Украинской ССР, Киев, 1952.
11. *Klieneberger-Nobel, E.:* Bact. revs. **15,** 77 (1951).
12. *Красильников, Н. А.:* Доклады *31,* 1, 1941.
13. *Lederberg, J. -all.:* Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. **16** 413 (1951).
14. *Lepeschinskaja, O. B.:* zitiert Калина (10).
15. *Luria, S. E.:* Bact. Revs. **11,** 1 (1947).
16. *McCarty, M.—Avery, O. T.:* J. Exp. Med. **83,** 89 (1946).
17. *Manninger, R.—Nógrádi, A.:* Acta Physiol. Hung. **1,** 6 (1948).
18. *Sevag, M. C.—Rosanoff, E. I.:* J. Bact. **63,** 243 (1952).
19. *Sia, R.—Dawson, M.:* J. Exp. Med. **51,** 701 (1931).
20. *Силбер, L. A.:* zitiert Калина (10).
21. *Taylor, E. H.:* Cold Spring. Harb. Symp. Quant. Biol. 16 (1951).
22. *Тимаков, В. Д.:* Микробиология, XXI, 250, 1952.
23. *Утенков, M. D.:* zitiert Калина (10) (1941).
24. *Висир, P. E.:* zitiert Калина (10) (1950).

МЕХАНИЗМ ТРАНСФОРМАЦИИ РИЗОБИУМОВ

Р. Балашша

Р е з ю м е

Ризобиумы являются весьма подходящими объектами для исследования трансформационных явлений ввиду того, что в процессе трансформации различных видов ризобиума наблюдается большинство описанных в спецлитературе трансформационных явлений. Так, например, были обнаружены следующие явления: способность образования клубеньков (вирулентность), способность связывания азота (эффективность), чувстви-

тельность к антибиотикам, несколько других биохимических свойств и изменение антигенной структуры. Изменения иногда касались только некоторых свойств, чаще распространялись на большинство и в некоторых случаях на все исследуемые свойства.

Целью исследований являлся анализ механизма трансформационных процессов. Для начала наиболее подходящим являлось изучение трансформативного образования резистентности к стрептомицину, которое может быть сопоставлено с образованием резистентности к стрептомицину под действием антибиотиков и таким образом создается возможность сравнительного исследования двух основных процессов: трансформаций, происходящих под действием субстрата и под влиянием клеток чужой наследственности.

Образование трансформативной резистентности к стрептомицину в первую очередь изучалось на исходном — чувствительном к стрептомицину — штамме и на резистентных по отношению к стрептомицину разновидностях того же штамма. Автор установил, что механизм трансформации — двухфазный процесс. Первой фазой может считаться фаза адсорбции, а вторая фаза является адаптационным процессом, в образовании которого значительная роль принадлежит некоторым аминокислотам.

В отношении образования резистентности к стрептомицину под действием антибиотиков автор выявил, что оно является также адаптационным процессом, на который оказывают действие те же аминокислоты, как и на образование трансформативной резистентности. Это обстоятельство разрешает предполагать тождественность каких-нибудь фаз этих двух, на первый взгляд совершенно различных механизмов.

У двух штаммов ризобиума, принадлежащих к двум различным видам и отличающихся один от другого по характеру обмена веществ, наблюдались различные механизмы образования резистентности к стрептомицину. Один из механизмов сходен с вышеописанным адаптационным процессом и изменение касается только этого одного свойства, а второй не представляет собой адаптационного процесса и характерностью его является полное изменение вида штамма. Автор предполагает, что для возникновения такого изменения необходимо наличие крупных единиц нуклепротеидного характера.

Применяемые до сих пор при трансформациях методы автор в своих опытах заменил новым методом трансформации путем ультразвуковой обработки, преимущественность которой состоит в том, что уже после первой обработки выявляются разновидности, и результаты эти могут хорошо воспроизводиться. С помощью данного метода представляется возможность разделения двух фаз механизма трансформации.

EFFECT OF PENICILLIN ON THE NUCLEIC ACID METABOLISM OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS

By
T. VÁLYI-NAGY, G. CSOBÁN and P. ZABOS

Institute of Pharmacology, University Medical School, Debrecen

(Received November 30, 1953)

In spite of the wealth of data on the mode of action of penicillin, it has not been established definitely which particular metabolic process of the susceptible organisms is affected by this antibiotic. In 1947, *Krampitz* and *Werkmann* [1] reported that washed *Staphylococci*, incubated over a prolonged period, would dissimilate their ribonucleic acid and that in its initial phases this process was inhibited by penicillin. Similar results were reported for *Clostridium sporogenes* by *Gros* and *Macheboeuf* [2]. In 1949, *George* and *Pandalai* [3] demonstrated that the penicillin effect was inhibited by Mg-ribonucleate. Similar evidence was reported for yeast extracts rich in nucleic substances by *Chattaway et al.* [4]. *Pratt* and *Dufrenoy* [5,6] are of the opinion that the main feature of the penicillin effect is the blocking of mononucleotide dephosphorylation. *Mitchell* [7], *Vályi-Nagy* and *Zabos* [8] and later *Mitchell* and *Moyle* [9, 10] have repeatedly established that penicillin interferes with nucleotide metabolism. The different phases of bacterial growth are accompanied by characteristic changes in nucleotide metabolism. [11, 12, 13, 14, 15]. The nucleic metabolism processes observable in the different phases of multiplication of the normal cell, und their interrelations, brought up the question whether penicillin had a specific effect on them and if so, what would be the physiological consequences of this effect.

On the basis of the above considerations, experiments have been performed in which the effects of penicillin on the nucleic metabolism of *Staphylococcus* have been studied in the different phases of bacterial growth.

Methods

A strain of *Staphylococcus aureus* (M. pyogenes Duncan) was used. Nucleic acid and its derivatives were determined by the method of *Schmidt* and *Thannhauser* [16] in some experiments, and by direct spectrophotometry as recommended by *Mitchell* [17] in others. In most instances a slightly modified version of *Knight*'s semi-synthetic medium was employed. This medium was composed of Casamin Wander, 5 g; glucose, 5 g; sodium citrate, 1,6 g; ferri-ammonium citrate, 0,001 g; sodium sulphate, 0,1 g; Na_2HPO_4, 7,1 g; NaH_2PO_4, 7,8 g; KCl 0,02 g; $MgCl_2$, 0,042 g; distilled water 1000 g. After adjusting the pH to 7,2, the medium was sterilised at 125°C for 30 minutes and 0,00125 g of nicotinic acid amide and 0,00025 g of aneurin were added.

In some experiments broth containing 1 per cent glucose was used. The bacteria were grown in spherical flasks of 1 to 5 litre capacity, sealed with a cotton wool stopper through which two glass tubes were inserted. One served for the introduction of sterile air to ensure aerobic conditions and the other for sampling. In those cases where the *Schmidt—Thannhauser* method was used, the inocula had to be large since this method requires a high amount of cells in the initial stage of growth. In general, the inocula were obtained from a preculture of 1 litre volume.

In direct spectrophotometry a considerably smaller amount of cells is required and in our experiments the cells derivable from a 50 ml preculture proved to be sufficient. The preculture was centrifuged under sterile conditions in order to remove traces of the culture medium. The mass of cells was washed with a few ml of distilled water suspended in the sterile medium employed in the experiment and used for inoculation. The dry weight of the inoculum was determined in every case.

Values yielded by analysis were referred to dry weight of *Staphylococci*. Dry weights were estimated by the turbidimetric method of *Mitchell* and *Válvi-Nagy* [18]. This method, in which a DU II Beckmann spectrophotometer is used, was subjected to revision in later work and it was shown by *Szabó, Csobán* and *Válvi-Nagy*[19] that even with normal cells, the turbidimetric method of estimation of staphylococcal dry weight yielded results influenced by a variety of factors. The nucleic acid changes in the different growth cycles are, however, of such an order of magnitude that exceeds the limits of error of spectrophotometry, so that it was possible to use the original method.

The experimental procedure was as follows. The organisms were grown in an incubator at 37°C. After inoculation, circulation of sterile air was started without delay, with the additional advantage of ensuring continuous mixing of the culture. Samples to be tested for growth rate and for nucleic substance content were taken at the onset of incubation and subsequently in intervals of 30 to 60 minutes. The samples taken were immediately cooled to 2—5°C in order to preserve them in their actual state.

At a certain stage of growth the culture was divided into two parts under sterile conditions. To one part penicillin was added while the other part served as control. The concentration of the crystalline penicillin G used was 1 μg per 1 ml culture.

In some experiments, as already mentioned, the *Schmidt—Thannhauser* method was used for estimating nucleic acids and their derivatives[16]. Fractionation was carried out by the original method, but for separating the fractions centrifugation was given preference over the orthodox filtration technique. The cell suspension was pipetted into a normal-bore centrifuge tube and centrifuged at 3500 r. p. m. The *Staphylococcus*-mass was repeatedly washed with distilled water, with repeated centrifugation. The cells so prepared were tested for ribonucleic acid (in the following: RNA), desoxyribonucleic acid (DRNA) and free nucleotide (Nt) contents by the Schmidt-Thannhauser method. The material to be analysed remained in the same centrifuge tube from the beginning of the examination until the very last step in the procedure, in order to reduce the sources of error. Phosphorus was estimated by *Fiske* and *Subbarow*'s method[27].

In experiments employing spectrophotometry for the estimation of nucleic substances, the total volume of the cultures was usually 1000 ml. Samples of 1 to 100 ml volume were obtained and treated as described above. The amount of distilled water for suspending the washed bacteria was so chosen that in the Beckmann spectrophotometer the suspension gave an extinction value of between 0,09 and 0,120, at a wave length of 350 mμ. This extinction range was used also for plotting the gravimetrically controlled dry weight curve. The method described by *Mitchell* [17] was employed in the rest of the procedure and the percentage of dry weight of nucleic substances was calculated according to the same author [17].

In preliminary experiments the bacterial suspension was tested for acidsoluble nucleotide fraction (free nucleotide fraction Nt) on the basis of extinction shown at a wave length of 260 mμ after treatment with cold trichloracetic acid.

Experimental

In Fig. 1 are shown the results of one representative experiment. It can be seen that during a complete growth cycle of the Staphylococcus culture, intracellular Nt (nucleotide) and nucleic acid (*na*) show characteristic quantitative changes. If there is a sufficiently long lag phase it becomes possible to estimate the Nt and total nucleic acid contents (Nt + *na*, in the following NA) with a

high degree of accuracy by the Mitchell method. This phase is characterized by a low growth rate and by a low *na* concentration in the cells, with a simultaneous increase of Nt. Right at the beginning of the logarithmic phase the intracellular Nt content begins to decrease at a constant rate. In the lag phase the increase in *na* is relatively negligible. The beginning of the logarithmic phase on the other hand, is marked by a sudden rise in *na*. The *na* content of the cells may increase to as much as four times the original within a matter of one or two hours. The maximum *na* content will be observed at the middle or

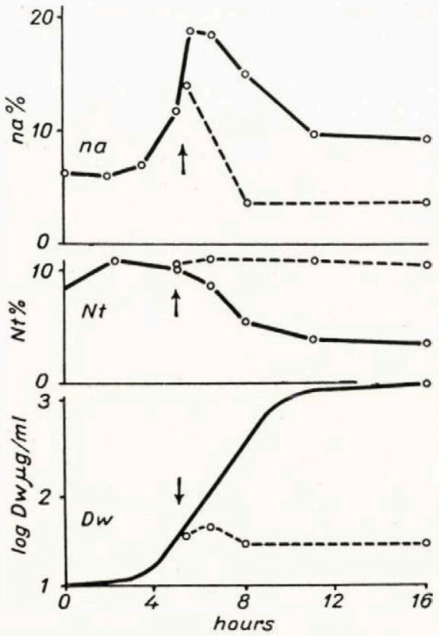


Fig. 1. Nucleic substance values in per cent of Staphylococcus dry weight. Dw: dry weight, Nt: acid fraction, *na* : nucleic acid. Solid line : normal culture. Broken line : penicillin-treated culture. Determination by spectrophotometry

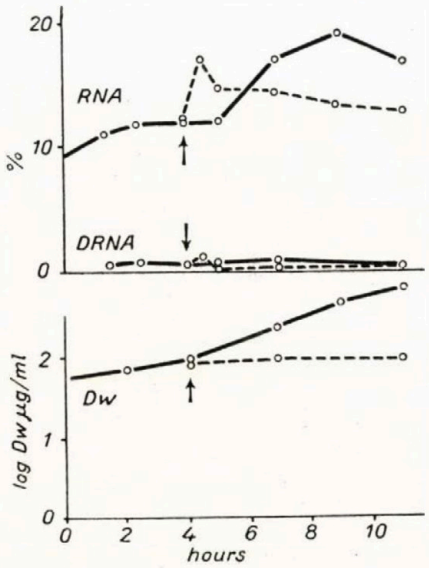


Fig. 2. Nucleic substance values in per cent of Staphylococcus dry weight. Dw : dry weight, RNA : ribonucleic acid, DRNA : desoxyribonucleic acid.
Solid line : normal culture.
Broken line : penicillin-treated culture.
Determination by the *Schmidt—Thannhauser* method

in the second third of the logarithmic phase, when it begins to decline, first, rapidly and then slowly.

Penicillin added to cells which are in the logarithmic phase of growth brings about an immediate drop in the multiplication rate. The cells keep on dividing for another 60 minutes, but the reduction in growth rate becomes evident. On penicillin the Nt content increases rapidly during the first few hours and at a lower rate later on, but the Nt level at the end of the experiment is still higher than that of the controls. In the logarithmic phase penicillin causes

a very slight initial increase, followed by a decrease of intracellular *na* more rapid than that in the controls.

The Mitchell method lends itself for the determination of NA and also of Nt, but not of RNA and DRNA. The various fractions of nucleic acid may be separated by the Schmidt-Thannhauser method. In the experiment illustrated in Fig. 2, the latter method was used. Untreated cells vary in RNA content more considerably than in DRNA content. For the changes in the *na* content due to penicillin the RNA component is responsible, there occurring no characteristic changes in the DRNA content of penicillin-treated cells.

A comparative study of the results shows that the NA values determined by the Schmidt—Thannhauser method are always higher than those obtained for the same sample by the Mitchell method. According to *Mitchell* and *Moyle* [20, 21], Gram positive organisms contain an organic phosphorus fraction (XP) that in the Schmidt-Thannhauser method separates together with the phosphorus fractions of RNA. The *na* value estimated on the basis of the phosphorus content is, consequently, on the average 25 per cent higher than that determined by spectrophotometry. In our comparative tests the mean NA content of the inocula was 8.6 per cent by spectrophotometry and 10.4 per cent by the *Schmidt-Thannhauser* method.

An analysis of the above discrepancy between the results obtainable by the two methods revealed that, within the range between the maximum and the minimum in a complete cycle, the variation of the *na* content depends on the size of the inoculum. The larger the inoculum, the smaller the range between maximum and minimum na values during the growth cycle. (Percentual values referred to dry weight).

In spite of the fact that the majority of data in the pertaining literature emphasizes that penicillin is effective against actively multiplying cells only, we extended the investigations to growth phases other than the logarithmic one. In the lag phase of Staphylococcus cultures no changes occur in the dry weight curves on the effect of penicillin, in accordance with anticipations (Fig. 3). In this phase the cells accumulate considerable amounts of Nt, composed mainly of mononucleotides, nucleosides and purin derivatives. At the end of the lag phase the cells of the culture increase their polymeric *na* concentration, while the Nt fraction is adjusted to a lower level. On the effect of penicillin the level of the Nt fraction becomes higher than in the controls, without any substantial change in the *na* content.

In further experiments *Staphylococcus* in the resting phase of growth was treated with penicillin and examined for changes in the nucleic acid metabolism. It was found that after an insignificant decrease the *na* level rose sligthly while the Nt content was similar to that of the controls (Fig. 4).

The relation of Nt to *na*, followed closely during the entire growth cycle, is most characteristic of changes in the nucleic substance. In Fig. 5 are shown

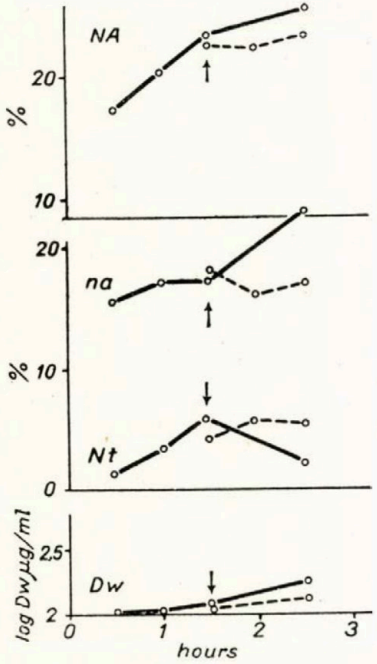


Fig. 3. Nucleic substance values in per cent of Staphylococcus dry weight. Dw : dry weight, Nt : acid fraction, *na* : nucleic acid, NA : total nucleotide
Solid line : normal culture
Broken line : penicillin-treated culture
Determimation by spectrophotometry

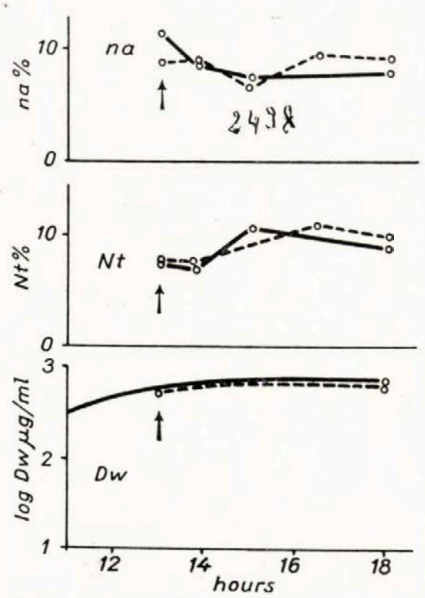


Fig. 4. Nucleic substance values in per cent of Staphylococcus dry weight. Dw : dry weight Nt : acid fraction, *na* : nucleic acid
Solid line : normal culture
Broken line : penicillin-treated culture
Determination by spectrophotometry

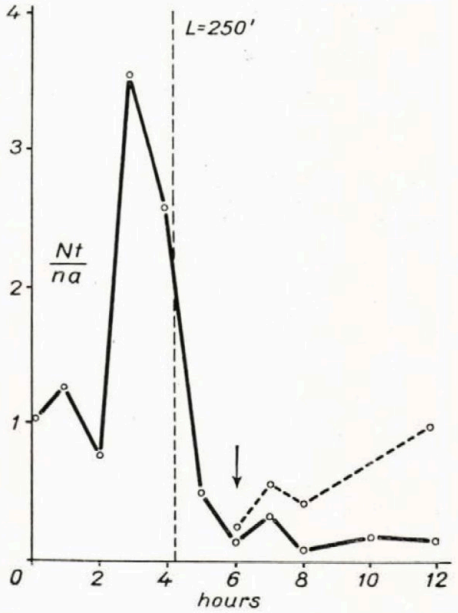


Fig. 5. Ordinate : Nt/*na* ration calculated on the basis of Nt and NA percentages
Abscissa : time in hours
Solid line : normal culture
Broken line : penicillin-treated culture
Determination by spectrophotometry
L : duration of lag phase in minutes

the changes of the Nt/*na* ratio for a culture of *Staphylococcus* with a prolonged lag phase. During the lag phase the ratio was about 1, with its value steeply rising at the end of the phase. During the first transitory phase of growth the value of the ratio drops suddenly. The beginning of this drop and the end of the lag phase are simultaneous. As a rule, the Nt/*na* value is less than 1 during the logarithmic phase. These results were obtained in experiments using inocula in which the age of the cells was 36 to 48 hours. When younger cells are used, the first part of the curve showing the changes of the Nt/*na* ratio illustrated in

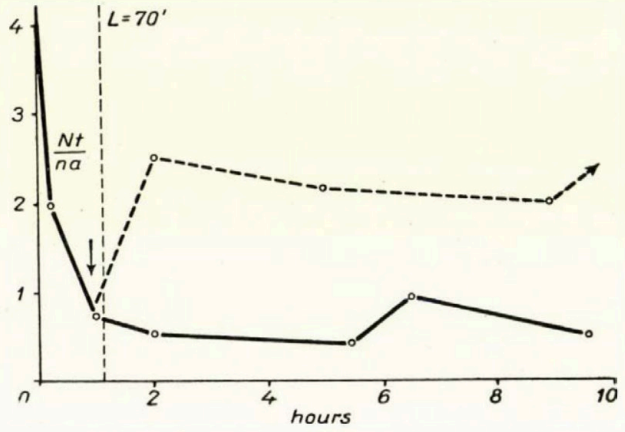


Fig. 6. Ordinate: Nt/*na* ratio calculated on the basis of Nt and NA percentages
Abscissa: time in hours
Solid line: normal culture
Broken line: penicillin-treated culture
Determination by spectrophotometry
L: duration of lag phase in minutes

Fig. 5 is absent, due to a shortening or absence of the lag phase. Illustrative of this are Figs 6 and 7, in which the Nt/*na* curves for an experiment made with 16 hour old cells are shown. Only the descending branch of the curve is present. If the cells of the inoculum are in the logarithmic phase of growth, the lag phase falls out and during the entire period the value of the Nt/*na* ratio remains below 1, as shown in Fig. 7. Penicillin treatment shifts the ratio in favour of the numerator in every case, i. e. the value of the ratio will be higher.

In order to test the specificity of the penicillin effect, experiments were made in which cells of *Staphylococcus aureus Duncan* were treated with streptomycin or mercury chloride under identical experimental conditions as those in the experiments with penicillin. Illustrative of such an experiment is Fig. 8, from which it can be seen that these agents affected the *na* content of the cells in a manner that resembled closely the penicillin effect. Penicillin leaves the Nt content at a level higher than normal, streptomycin and mercury chloride reduce it to below the normal. From this

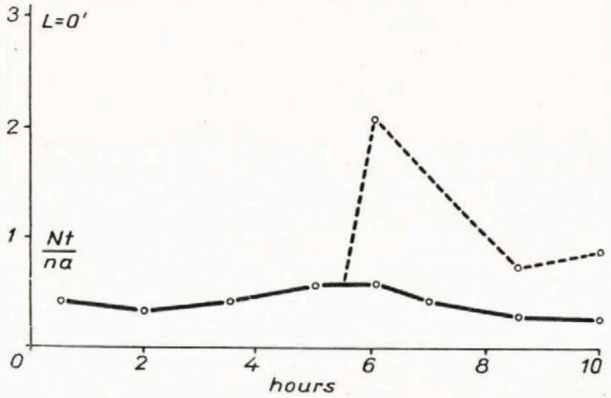


Fig. 7 . Ordinate : Nt/*na* ratio calculated on the basis of Nt and NA percentages
Abscissa : time in hours
L : duration of lag phase in minutes
Solid line : normal culture
Broken line : penicillin-treated culture
Determination by spectrophotometry

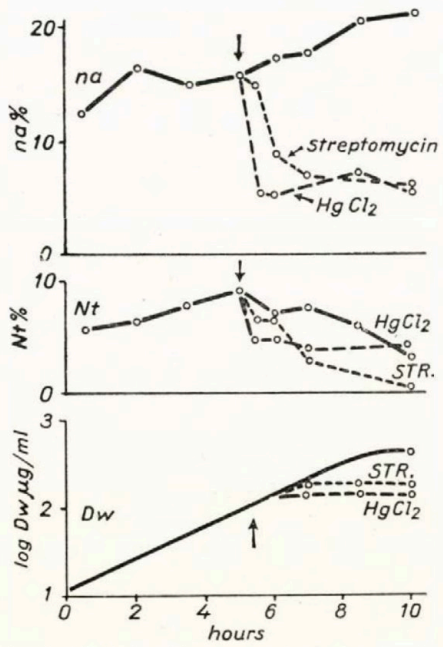


Fig. 8. Nucleic substance values in per cent of Staphylococcus dry weight. Dw : dry weight, Nt : acid fraction, *na* : nucleic acid
Solid line : normal culture
Broken line : culture inhibited with the agent specified in the figure
Determination by spectrophotometry

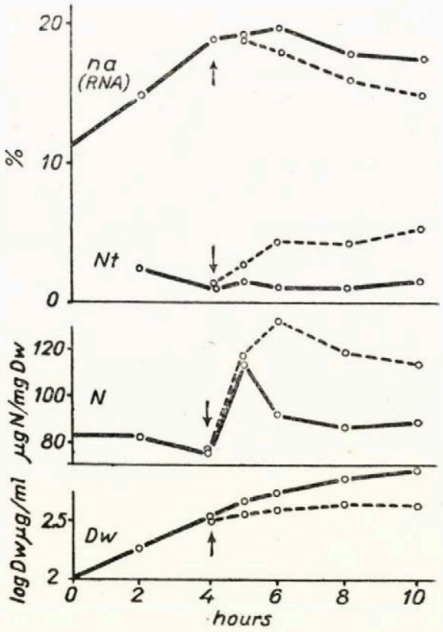


Fig. 9. Nucleic substance values in per cent of Staphylococcus dry weight. Dw : dry weight Nt: acid fraction, *na*: nucleic acid, N: »non-nucleotide N« content of Staphylococcus, g per mg dry weight
Solid line : normal culture Broken line: penicillin-treated culture. Determination by the Schmidt-Thannhauser method

it follows that the changes in the value of the Nt/*na* ratio on the effect of penicillin cannot occur with streptomycin or mercury chloride.

In some experiments the total nitrogen content of the cells was also determined in different phases of growth. From this the N value corresponding to that of NA was subtracted (the amount of N per 1 P atom in the tetranucleotide-structure was used in the calculations). The shape of the curves in Fig. 9 illustrates that the sudden rise of »non-nucleotide N« occurs at the peak of RNA synthesis, and slowly declines thereafter. The peak of RNA synthesis is reached at the most active phase of cell division, i. e. the quantitative increase of bacterial proteins corresponding to the «non-nucleotide N» sets in at an advanced stage of RNA synthesis. This observation is in agreement with the results obtained by a different method by *Caspersson* [11], who also found that RNA synthesis preceded the synthesis of cell proteins. Similar findings were reported by *Malmgren* and *Heden* [12]. They are also of the opinion that NA synthesis occurs prior to the synthesis of cell substances. Penicillin increases considerably the amount of intracelular »non-nucleotide N«.

Discussion

The findings reported confirm in many relations the results obtained by earlier workers [9, 10, 7, 17, 18]. Young bacterial cells capable of division are rich in NA, which consists of RNA in the first place [14, 13]. At the end of the lag phase and at the beginning of the logarithmic phase *na* production preponderates over cell division. Later the growth rate surpasses the rate of *na* production. From this it follows that cells taken from young cultures contain more *na* than cells originating from cultures in the terminal logarithmic phase or in the resting one. At the beginning of the lag phase there is a low intracellular *na* level and the Nt content is relatively high. During the multiplication cycle the equilibrium between nucleic substances shifts, as best illustrated by the changes in the Nt/*na* ratio. On the basis of these changes it can be stated with certainty that in the lag phase preparatory to multiplication nucleic acids supply the major part of the NA content of cells. On further propagation the equilibrium suddenly shifts in favour of na, as shown by the sudden rise of the value of the Nt/*na* ratio. After reaching a maximum, this ratio drops steeply, indicating the increased rate of *na* synthesis which begins at the end of the lag phase. The logarithmic phase of cell multiplication is thus preceded by Nt accumulation in the cells. In the logarithmic phase the value of the Nt/*na* ratio drops below 1 and shows only very little variability. This change appears to indicate that for the autocatalytic initiation of protein synthesis in the cytoplasm a dynamic equilibrium must exist between Nt and *na*. In conformity with this observation is the behaviour of the »non-nucleotide N«

fraction. This begins to increase in quantity after the onset of *na* polymerisation i. e. simultaneously with the beginning of protein synthesis in the cells. The course of changes in the Nt/*na* ratio is disturbed by penicillin which brings about an increase of cellular Nt at the expense of *na*.

The experiments have shed light on another important effect of penicillin. Penicillin makes the »non-nucleotide N« per »nucleotide N« ratio shift in favour of the numerator. In normal cells this ratio decreases at the end of the lag phase and during the first two-thirds of the logarithmic phase and increases during the rest of the multiplication cycle. Our observation that prior to the logarithmic phase the synthesis of Nt and *na* predominates over that of proteins in the bacterial cell is in agreement with the findings of the Scandinavian authors cited above [11, 12]. In older cells this ratio shifts in favour of protein production. The nature of the excess »non-nucleotide N« fraction brought about by penicillin is not known. *Hotchkiss* [22] incubated washed Staphylococcus with penicillin, in a buffer solution containing amino acids and glucose. Under these conditions a 10 to 30 per cent excess of N was found in the cells, at the expense of the extraneous sources of nitrogen. According to *Hotchkiss*, penicillin would modify the protein-synthetising capacity of cells and although no excess of protein is demonstrable in the cells, assimilation of larger-molecule peptides occurs in the incubation fluid. Our experimental conditions were different, but it may also be assumed that the »non-nucleotide N« fraction found in penicillin-treated cells corresponds to some »pathological« protein product.

On the basis of the results reported by *Morse* and *Carter* [23], and on strength of personal experience, *Pratt* and *Dufrenoy* [5, 6] came to the conclusion that normally growing cells synthesise mainly RNA during the lag phase, which, according to our own experiments, cannot be considered to be uniform with respect to nucleic substance synthesis. In the early part of the lag phase, preponderantly bases, and eventually nucleotides and nucleosides, are produced. The synthesis of *na* begins only after the rate of this base-synthesis has surpassed a certain level and only after that will the cells begin to multiply at a rapid rate. This observation confirms the data reported by *Mitchell* and *Moyle* [9, 10]. The penicillin-induced changes of metabolism have been studied in washed suspensions by some authors and under conditions aphysiological for the cells by others. This may account for the contradictory findings. In our opinion it is only the study of the nucleic acid metabolism of the developing Staphylococcus that may give a proper picture of the penicillin-induced changes. The metabolic disturbance induced by penicillin is not due to the blocking of a single process, but is the result of a dissociation of a series of simultaneous processes.

The progressive decrease of the RNA components on exposure to penicillin is not a specific feature. Neither is it justified to assume, as some authors do [1, 2, 5, 6], that the one and only site of action of penicillin would be the enzyme (phosphatase) playing a role in the catabolism of mononucleotides.

Our experiments seem to show that the cardinal feature of penicillin action consists in a disturbance of the dynamic equilibrium between the three main components playing a part in cell divison, Nt, *na* and protein, insofar as the *na* content is reduced, the Nt increased. The disturbance in the equilibrium of synthesis may account for the production in the cells of a pathological protein fraction or of a peptide.

In future investigations concerning the effect of penicillin we attribute a basic significance to the experiments of *Maas* and *Johnson* [24], as well as to those by *Cooper* and *Rowley* [25]. These authors have proved that the cells are capable of binding a well defined quantity of penicillin. According to this, the biologically young cell would possess a component reacting with penicillin. It may be assumed that this component is a cell-metabolite enzyme not yet isolated or some other substance of protein nature. In this respect a certain significance must be attributed to the observation of *Jeney* [26] that it is the non-natural serine component of penicillin which enters the bacterial protein. Whatever this substance, it probably plays an important role in the regulation of the interrelated processes of cell metabolism. It may be assumed that this cell component, present in minute quantities, is inhibited by penicillin and as a result a dissociation of metabolic processes indispensable in the multiplication of cells occurs.

SUMMARY

Normal and penicillin-treated cultures of *Staphylococcus aureus Duncan* were examined for changes in nucleic metabolism. It was found that under normal conditions in biologically young cells the nucleotide per nucleic acid ratio shifts in favour of the numerator while in old ones the shift occurs in favour of the denominator. On the effect of penicillin, the ratio shifts in favour of the numerator. During normal cell growth the rapid increase of »non-nucleotide N« (mainly bacterial protein) starts at the peak of polynucleotide fraction production. On the effect of penicillin the »non-nucleotide N« per »nucleotide N« ratio shifts in favour of the numerator. This is thought to be due to the production of some »pathological« protein by the cells. During the normal growth cycle a certain regularity was observed in the chronological succession of the intensity of intracellular processes. The beginning of nucleic acid synthesis appears to be bound to a certain threshold level of nucleotide fraction synthesis, while later another critical point of nucleic acid synthesis will mark the beginning of the »non-nucleotide N« synthesis. These interrelated processes are disorganized by penicillin.

LITERATURE

1. *Krampitz, L. O., Werkman, C. H.:* Arch. Biochem. **12,** 57 (1947).
2. *Gros, F., Macheboeuf, M.:* Ann. Inst. Pasteur **74,** 368 (1949).
3. *George, M., Pandalai, K. M.:* Indian. J. Med. Res. **37,** 151 (1949).
4. *Chattaway, F. W., Hall, D. A., Happold, F. C., Holdsworth, E. S.:* Nature, **164,** 314 (1949).
5. *Pratt, R., Dufrenoy, J.:* Texas Reports Biol. Med. **7,** 180—219 (1949).
6. *Pratt, R.: Dufrenoy, J.:* J. Bact. Rev. **12,** 79 (1948).
7. *Mitchell, P. D.:* Nature **164,** 259 (1949).
8. *Válvi-Nagy, T., Zabos, P.:* Unpublished data.
9. *Mitchell, P. D., Moyle, J.:* Nature **166,** 218 (1950).
10. *Mitchell, P. D., Moyle, J.:* J. Gen. Microbiol. **5,** 421 (1951).

11. *Caspersson, T.:* Symposion of the Society for Exp. Biol. Cambridge University Press (1947).
12. *Malmgren, B., Heden, C.:* Acta Path. Microbiol. Scand. **24,** 472 (1947).
13. *Boivin, A.:* C. R. Soc. Biol. Paris **142,** 1258 (1948).
14. *Belozersky, A. N.:* Cold Spring. Harb. Symp. on Nucleic Acids. (1948).
15. *Caldwell, P. C., Mackor, E. L., Hinshelwood, C.:* Amer. J. Chem. Soc. 3151 (1950).
16. *Schmidt, G., Thannhauser, S. J.:* J. Biol. Chem. **161,** 83 (1945).
17. *Mitchell, P. D.:* J. Gen. Microbiol. **4,** 399 (1950).
18. *Mitchell, P. D., Vályi-Nagy, T.:* J. Gen. Microbiol. **3,** xviii (1949).
19. *Szabó, G., Csobán, G., Vályi-Nagy, T.:* Unpublished data.
20. *Mitchell, P. D., Moyle, J.:* J. Gen. Microbiol. **5,** 966 (1951).
21. *Mitchell, P. D., Moyle, J.:* J. Gen. Microbiol. **5,** 981 (1951).
22. *Hotchkiss, R. D.:* J. Exp. Med. **91,** 350 (1950).
23. *Morse, M. L., Carter, C. E.:* J. Bact. **58,** 327 (1949).
24. *Maas, E. A., Johnson, M. J.:* J. Bact. **58,** 361 (1948).
25. *Cooper, P. D., Rowley, D.:* Nature **163,** 480 (1949).
26. *Jeney, A.:* Hung. Acta Physiol **1,** 142 (1947).
27. *Rona, P.:* Praktikum der physiol. Chemie. Berlin, Springer 1929 Vol. 2. p. 257.

ДЕЙСТВИЕ ПЕНИЦИЛЛИНА НА ОБМЕН ВЕЩЕСТВ НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ КУЛЬТУР STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Т. Вайи-Надь, Г. Чобан и *П. Забоши*

Резюме

Авторы сравнивали изменения нуклеинового обмена в нормальных и в обработанных пенициллином культурах Staphylococcus aureus Duncan. Они определили, что при нормальных условиях пропорция Nt/*na* в биологически молодых клетках смещается в сторону числителя, а в более старых клетках — в сторону знаменателя. Под действием пенициллина пропорция Nt/*na* смещается в сторону числителя. В процессе нормального размножения клеток бурное размножение »не нуклеотидной N« — фракции (в преобладающей мере белок бактерий) наступает на кульминационной точке образования полинуклеотидной фракции. Под действием пенициллина пропорция »не $\frac{\text{нуклеотидный N«}}{\text{»нуклеотидный N«}}$ смещается в сторону числителя: клетки вероятно образуют »патологическое« белкоподобное вещество. При нормальном цикле размножения наблюдается определенный порядок во времени интенсивности происходящих в клетках процессов. Начало синтеза нуклеиновой кислоты клеток связано с определенной предельной величиной синтеза фракции Nt. В течение дальнейшего развития, на новой критической точке синтеза нуклеиновой кислоты начинается образование »не нуклеотидной N« — фракции. Под действием пенициллина эти — связанные между собой — частичные процессы дезорганизуются.

PRODUCTION OF ANTITETANUS SERUM IN CATTLE

P. OLÁH

Phylaxia State Serum Institute, Budapest

(Received December 5, 1953)

Serum used for preventive inoculation against tetanus is mostly produced in horses. In view of the risk of the anaphylactic shock which may follow repeated administration of horse serum, attempts have since long been made to use other animal species, i. e. mules, cattle, sheep, goats, for the production of tetanus antitoxic serum.

By virtue of their great body bulk, cattle seemed suitable for serum production. In spite of this, only few pertaining data are known. It was thought that a serum of low protective value, of about 100 I. U., could only be produced in cattle (*Kraus* [8, 9], *Becker* [2]). In the last 4 years, in our Intsitute the antitoxic titre of blood serum produced in cattle amounted on the avarage to 125 I. U. The advantage of cattle serum consists in its lack of toxity and in the fact that following its administration serum sickness is rare (*Kraus* et al. [8]). Cattle serum is economical because the animals may be used for serum production for years and, as compared to horses, the protective value of their serum does not notably decrease even with repeated exploitation. Our efforts were directed at ascertaining three factors that would make possible the production of a serum of higher protective value. The three points were (i) selection of suitable subjects for serum production, (ii) elaboration of an adequate procedure for hyperimmunization, (iii) quantitative and qualitative test of the antigen used for hyperimmunization.

Experiments

The experiments were usually undertaken on groups of 10 cattle. The animals were of various ages and belonged partly to a Hungarian red-dappled kind and partly to a crossed one. The toxin, viz. toxoid used as antigen in the experiments was prepared in equine blood containing 1 per cent glucose, broth and Taylor broth. The antibody content was checked every two days, in some cases daily. Titration of the serum was made on mice, according to Ehrlich's method. The data given in the Tables present mean values of the blood serum of the experimental group.

The selection of serum producers

Age. The influence of age was examined by comparing the antitoxin content of the sera of cattle under 4 and over 7 years of age given the same treatment (Fig. 1). It was striking to note that in mature cattle a serum of higher value could be produced. The results confirmed the earlier observations of *Kraus* and *Sordelli* [8].

Natural antibody content. Römer [19, 20] frequently found antitoxin occurring naturally in the blood sera of cattle not inoculated against tetanus.

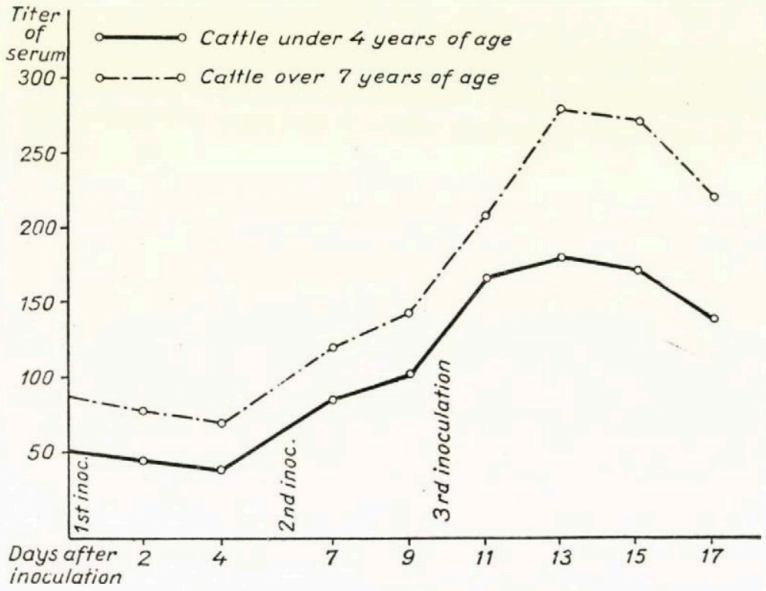


Fig. 1

Kraus and *Sordelli* [8] consider the natural antibody content of serum an essential selective factor, because they found that in such animals a serum of high value can be obtained. In contrast with this, *Lemetayer* et al. [13, 14] have merely observed that in cattle whose blood serum contains natural antitoxin, antibody production, on the effect of the first inoculation, starts a few days sooner. According to *Archipow* [1] and *Becker* [2] a serum of higher value can be obtained in animals selected according to their natural antitoxic content only if the serum producing animals are at the same time also toxin tolerant.

In our own experiments we found in the blood sera of 12 out of 123 cattle not inoculated against tetanus, 1/50 or more units of antibody. The highest antibody content occurring naturally was 4 I. U. per ml. Hyperimmunization of cattle containing natural antibody in their blood serum was tested on a group consisting of 10 animals. Out of these the blood serum of 3 contained 1/50 to

1 I. U. of antitoxin. The inoculations occurred with the same antigen, with the same quantity and at the same time. The results are shown in Fig. 2. According to these, cattle containing natural antibody respond with a more abundant antitoxin production to 20 ml alum-precipitated toxoid, which induces basal immunity, than animals devoid of antitoxin. The increased antitoxin production of the former persists for some time after the first hyperimmunizing inoculations. In the course of further inoculations, along with the increase in the quantity of antigen, the difference in antibody production disappears gradually. It was also observed that in cattle possessing natural antitoxin antibody production after the first inoculation starts a few days earlier. (In one of the animals it started on the 5th, in other two on the 6th day.) On the other hand, in cattle

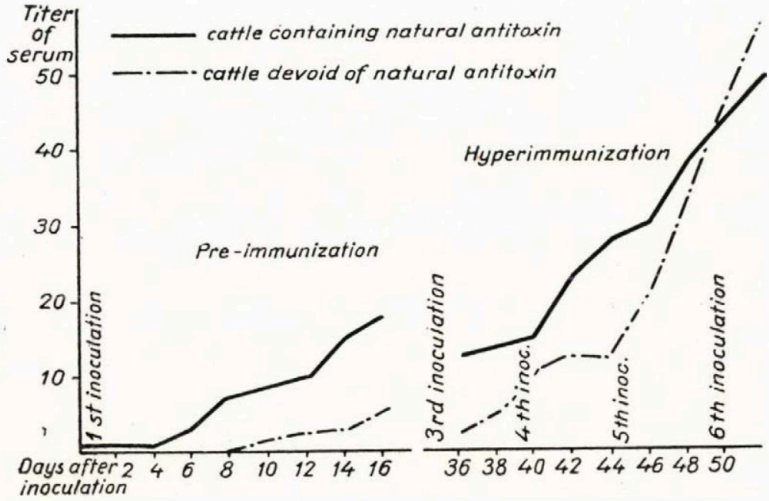


Fig. 2

in which antitoxin does not occur naturally, an amount of 0,5 units of antitoxin was demonstrable at the earliest on the 8th day following inoculation.

It was established from the experiments that the natural antibody content is not a suitable basis for selecting serum producing animals.

The degree of basal immunity. The problem arose whether the degree of the immune response elicited by the first inoculation which had induced basal immunity might supply information as to the attainable highest protective value of the blood serum. The animals used in the experiment were injected with 10 ml of the same alum-precipitated toxoid at identical times.

The antibody content of the blood serum was tested 21 days after the first inoculation, and also after completing hyperimmunization, which was carried out in an identical manner. The results of the tests are recorded in Table I. Whilst the relatively few tests allow no definite opinion to be formed, they

TABLE I

Nº of cattle	Antibody content of the serum in I. U., 21 days after inoculation	Antibody content of the serum in I. U. after completing the hyperimmunization
24	2	225
25	4	180
26	3	150
27	2,5	150
28	2	130
29	6	100
30	18	200
31	12	180
32	6	120
5	8	75
7	3	120
8	15	150
10	4	100

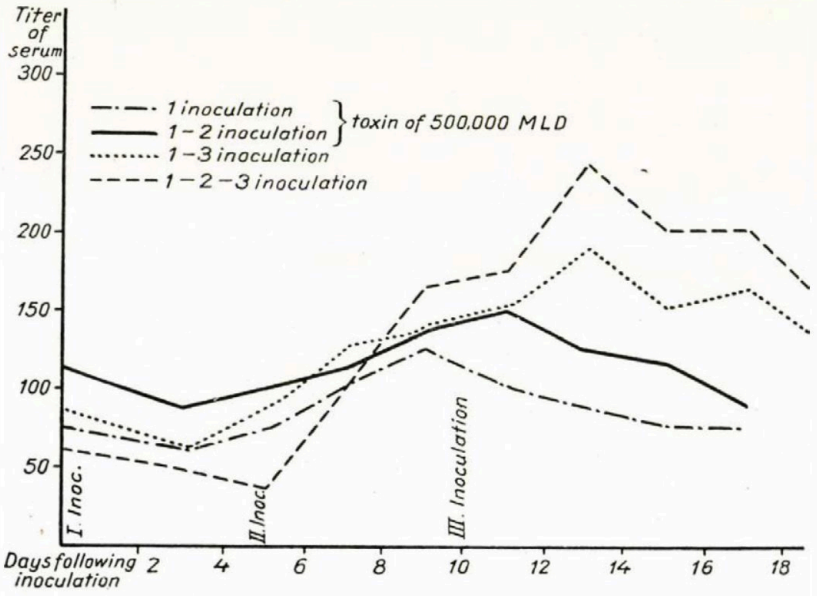


Fig. 3

nevertheless permit of the conclusion that no correlation exists between the titre determined after the first inoculation, and the protective value attainable in the course of hyperimmunization.

Hyperimmunizing procedure

Number of inoculations. For examining the action of inoculations on the antitoxin content of blood serum, the animals were divided into 4 groups and were inoculated in the following manner. The first group received 300 ml of toxin in a single injection. The second group was given 300 and 400 ml of the same toxin in 5-day intervals. The third group received 300 and 500 ml in 10-day

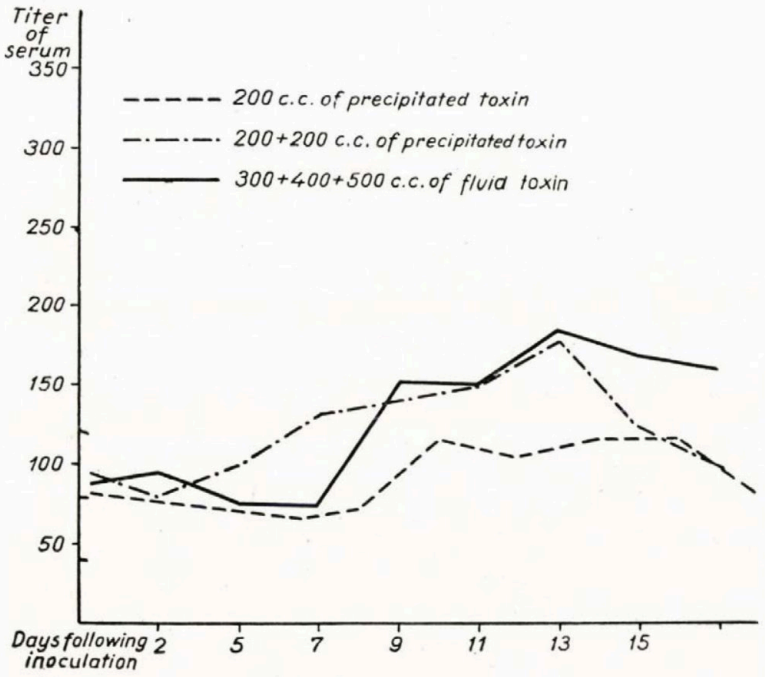


Fig. 4

intervals. Animals in the fourth group were administered first 300 ml, then 400 ml and finally 500 ml of the same antigen, in intervals of 5 days. It can be ascertained from the data in Fig. 3 that the antitoxic level in the serum of cattle inoculated once was the lowest of all and that it attained its maximum value on the 9th day after inoculation. The mean value of the serum was higher in the second group than in the first one and the peak was reached on the 11th day following inoculation. The antibody content of the serum of the third group was higher than that of the former group and contained the greatest quantity of antitoxin on the 13th day after inoculation. Animals in the fourth group, which had been given 3 inoculations, were the richest in antitoxin and the antibody content reached its peak on the 13th day following the first inoculation. It may

be concluded from the tests that the maximum antitoxin level may be attained by means of three consecutive inoculations with increasing doses.

Inoculation with alum-precipitated toxin. It was also examined whether the series of three inoculations might be replaced by a smaller number of inoculations with a smaller amount of alum-precipitated toxin, in view of the protracted stimulating effect of the latter material. The experiments were carried out on two groups of cattle. Animals in the first group were given 100 ml of

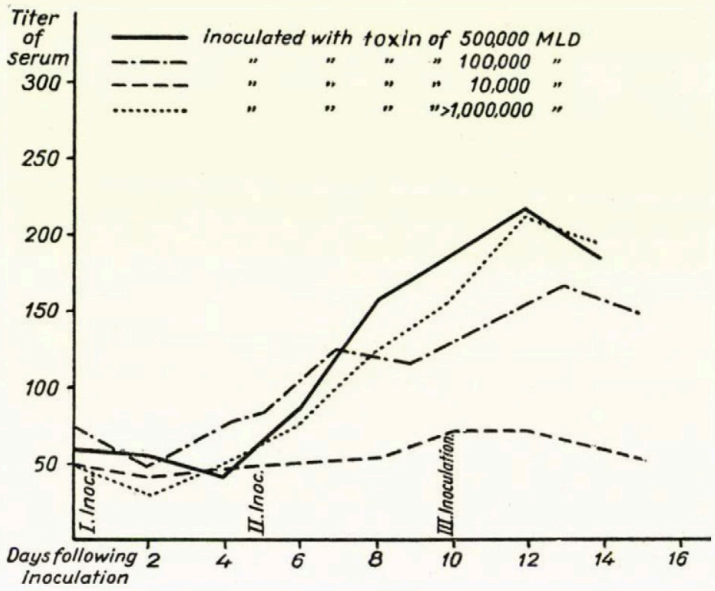


Fig. 5

toxin adsorbed to an equal amount of a 2 per cent solution of aluminium hydroxyde. The second received the same antigen and 8 days later a second inoculation with 100 ml of alum-precipitated toxin. The results listed in Fig. 4 show that a single inoculation with precipitated toxin raised but slightly the antitoxic level of the serum, and that the titre, just as in the case of fluid toxin, reached its peak on the 9th day following inoculation. On the other hand, the serum of animals inoculated twice with precipitated toxin contained the highest amount of antibody on the 13th day following inoculation, and the level was the same as the one obtained after three inoculations with 300, 400 and 500 ml of nonabsorbed toxin of a similar MLD. It follows that instead of the three inoculations one large dose of precipitated antigen might also be administered. The procedure, however, is of no practical value because of tissue damaging effect of $Al(OH)_3$.

The antigen used for hyperimmunization

Quality of the antigen. The influence of the quality of the antigen was studied only in horse serum production. *Ramon* [18] employed toxin of 24 L. F. or of 1,500.000 mouse MLD. *Chertkov* [23] chose the antigen on the basis of precipitation tests. *Ponomaryev* [23] hyperimmunized with toxoid but ascribed a great significance to the MLD of the toxin from which the toxoid was pre-

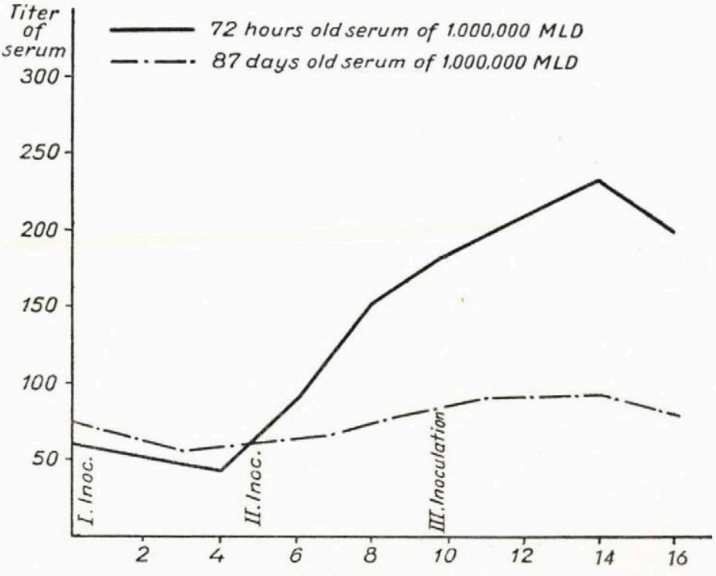


Fig. 6

pared. These authors ascertained a correlation between the values obtained by means of various measurements and the effect of the antigen.

The correlation between the MLD for the mouse of the toxin employed as antigen and its antigenic effect was therefore studied. For the sake of correct comparison we inoculated the same 11 animals in four consecutive bleeding cycles with toxins of different MLD. The inoculation consisted injecting 300 ml, then 400 ml and finally 500 ml of the same toxin in intervals of 5 days. Estimation of the MLD was always made immediately before the first inoculation. The toxin for the two subsequent inoculations was kept in a refrigerator at + 4°C. In the first cycle, the toxin contained 10,000 MLD ; in the second, 100,000 MLD ; in the third cycle 500,000 MLD. It may be seen from the results of the experiments recorded in Fig. 5 that the antitoxic level of the blood serum hardly rose after inoculation with a toxin of 10,000 MLD. The effect of toxin containing 100,000 MLD was considerably better, and still better was the antigenic effect of material containing 500,000 MLD or more than 1,000,000 MLD.

Thus, a definite correlation was established between the MLD of the toxin and its antigenic effect although the antigenic effect does not increase proportionally with the increase of the MLD. It was also observed that above 500,000 MLD the antitoxic level was no more markedly influenced. According to these facts, it is possible to conclude from the MLD value of the toxin to its antigenic value and also that a toxin of 500,000 MLD or more is the most appropriate for hyperimmunization of cattle.

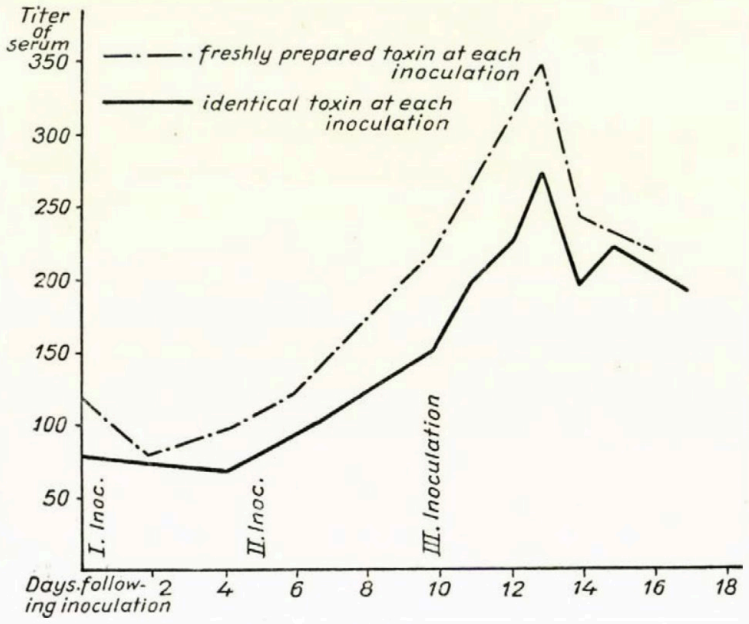


Fig. 7

Age of the antigen. All the above refer to fresh toxin. It is, however, known that toxin deteriorates with time. Since *Eisler's* [5,6] and *Löwenstein's* [12] experiments it is generally believed that despite its deterioration the toxin retains partially or completely its immunizing capacity. Our experiments were accordingly extended to the study of the antigenic value of deteriorated toxin. With this object in view, a group of animals was inoculated first with stored toxin and in the subsequent cycle with freshly prepared toxin. The first series consisted of three inoculations with 300, 400 and 500 ml of toxin stored for 87 days at + 4°C. Until the day of inoculation the MLD of the toxin decreased from the original 1.000,000 to 5000 MLD. In the next cycle we employed an identical amount of fresh toxin of 1,000,000 MLD kept for altogether 72 hours in a refrigerator. The results of the experiment are presented in Fig. 6. The data show that the antigenic value of stored toxin is slight, making the initial level of the antitoxic titre rise by not more than 20 I. U. On the other hand, the excel-

lent antigenic effect of freshly prepared toxin was well demonstrated by the rise of the antitoxic titre to eight times the initial. The rapidity of deterioration is variable. For instance, immediately after filtration the MLD of toxin No 286 was 1,200,000. 48 hours later, kept at + 4°C, it was 300,000 ; after 4 days it was 60,000 ; after 8 days it was 20,000 ; and 11 days later the MLD was likewise 20,000. The minimum lethal dose for the mouse of toxin No 291 was 1,000,000 on the day of filtration, 800,000 after 72 hours in the refrigerator, 300,000 after 6 days, 200,000 after 10 days and 50,000 after 13 days. Thus, loss of toxicity is considerable in the first 8 days.

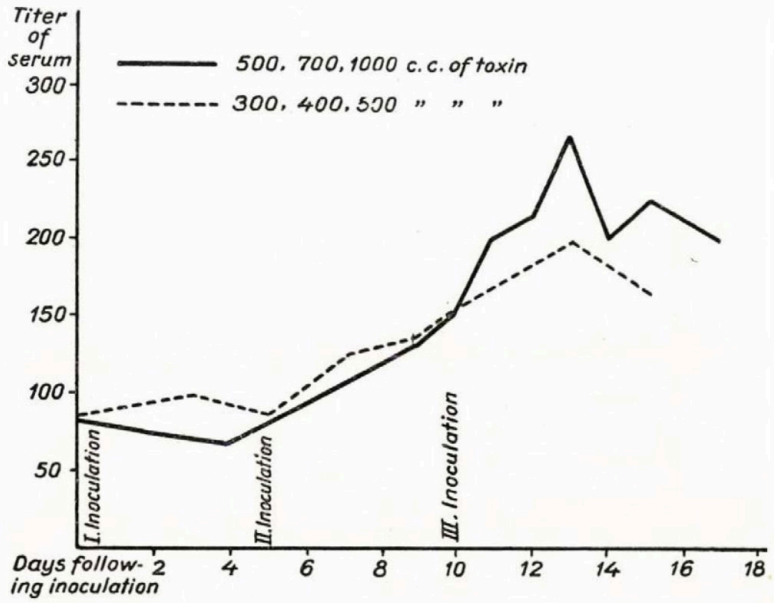


Fig. 8

According to the usual practice, the same toxin was used for serial inoculations. In this case, even if a toxin only a few hours old was employed for the first inoculation, at the second inoculation the toxin was at least 4-day- old while 8-day- old at the third inoculation. During this time the MLD of the toxin and along with it the antigenic value decreased considerably even at a temperature of + 4°C. In order to verify this, we inoculated a group including 10 cattle first with 400 ml then with 600 ml and finally with 800 ml of the same toxin containing 1,000,000 MLD. The toxin was stored at + 4°C. In the next series the same amounts were administered as before but each inoculation occurred with toxin only 48-hour- old. 100,000 MLD were given in the first inoculation, 600,000 MLD in the second and 500,000 MLD in the third one. On the strength of the results recorded in Fig. 7 the highest rise in antitoxic level thus recorded

was brought about by toxin of high toxicity, freshly prepared for every inoculation and given in increased doses. The graph presents the mean serum values of 10 cattle. Several of the animals produced considerably better serum. The highest value attained was 600 I. U. Since then the serum of the same animal attained 1,000 I. U.

Quantity of the antigen. According to the common practice, hyperimmunization of cattle was made with quantities usual with horses, although the weight

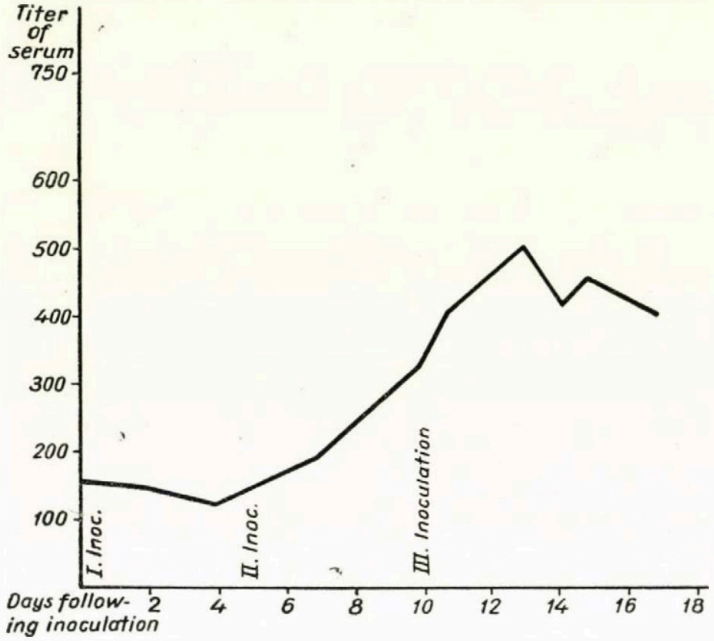


Fig. 9

of cattle is about double of that of horses. No data are available as to the sensibility to toxin. It would, however, appear from Behring's data relating to small ruminants that cattle are much less susceptible to tetanus toxin than horses. On the strength of these considerations it was attempted to increase the amount of toxin for hyperimmunization. A group including 10 animals was inoculated first with 500, 700 and 1,000 ml of freshly prepared toxin of 400,000 MLD, and in the next cycle with 300, 400 and 500 ml of similarly fresh toxin of 500,000 MLD. It is seen from the data in Fig. 8 that the antitoxin content of the blood serum rose to 270 I. U. in the first case, while in the second cycle it increased only to 200 I. U. It is consequently possible to increase the antitoxic level of blood serum by increasing the amount of antigen.

Time of withdrawing blood. In high value antitoxic serum production it is of a paramount importance to determine the best time of blood withdrawal. This must be performed at the moment when the blood contains the greatest

quantity of antibody. Literary data referring to the time of blood withdrawal are conflicting and refer only to horses. *Ramon*, *Lemetayer* and *Mustafa* [17] administered 3 inoculations in five-day intervals and took blood on the 10th day following the third inoculation. According to *Ponomaryev*, [23] the 5th or 6th day after the last inoculation is the one most suitable. *Schneider* [22] contends on basis of careful studies that the 13th day after the first inoculation is the best time for taking blood. *Kemény* [10] obtained similar results in horses producing antitoxic serum. In order to establish the most suitable time, we tested the serum of 11 animals after three inoculations given in five-day intervals. 6 of the 11 sera contained the greatest quantity of antibody on the 13th day following the first inoculation, 3 on the 12th day and only two on the 15th day. According to these data, in hyperimmunized cattle too, the largest amount of antitoxin is contained in the blood serum on the 12th and 13th day after the first inoculation ; this was also evidenced in the trend of the mean serum titres of the 11 cattle (Fig. 9).

Discussion

According to the literary data available, the protective value of antitetanus serum produced in cattle is lower than that of the serum produced in horses, 100 I. U. or somewhat higher at the most. The above results prove that the antitoxic titre of the serum depends on numerous factors and that a considerably higher value than 100 I. U. can be produced in cattle. Careful selection of the serum-producing animals is important. As to age, mature animals over 7 years of age prove the best serum producers. Advanced age does not limit the period of production and the toxin toleration of aged animals appears also to be greater, because early death occurs among them less frequently than in young animals. The build of the animals may also play a role in high-value serum production. A better serum of higher protective value can be produced in lean, motile animals than in heavy ones inclined to put on fat. Natural antibody is frequently present in the serum of cattle, it was found in about 10 per cent of the animals tested. However, at variance with certain authors, the presence of occult antitoxin does not yet promise production of a serum of higher value. Further studies will have to decide whether the toxin tolerance reported by *Archipow* [1] along with the natural antitoxin content, guarantees a higher antitoxic level. Neither is the antitoxin content of the serum taken 21 days after the first inoculation indicative of the maximum antibody content attainable in cattle devoid of natural antitoxin. In order to maintain the titre, at least 3 inoculations are necessary. With a smaller number of inoculations the serum antitoxic level will be lower. Further investigations are required to elucidate whether the antibody content of the serum could be increased by increasing the number of inoculations. In the United States 4 to 5 inoculations

with alum-precipitated toxin are given to horses for maintaining the titre. It was verified in the course of the experiments that with cattle a smaller number of alum-precipitated antigen inoculations suffices to obtain the same antitoxic level. In view of the severe local reactions arising in the wake of inoculations, full exploitation of the animals is, however, limited. A correlation was ascertained between the MLD value of the toxin employed and its antigenic effect. The higher the MLD of the toxin, the greater the effect of the antigen, but only within certain limits. An MLD of over 500,000 does not bring about a further increase of the antigenic effect. An essential condition of high value cattle serum production is that the MLD of the toxin should exceed 500,000. A satisfactory antigenic effect can be expected from freshly prepared toxin only. Toxicity may deteriorate in a considerable measure even within a few days and also the antigenic value decreases. Accordingly, only toxin prepared freshly for every single inoculation ensures the adequate antigenic effect and the production of a high value serum. The serum antitoxic level may further be enhanced by increasing the amount of freshly prepared antigen of high toxicity. Summing up the results of the experiments, it may be stated that it is possible to produce in cattle serum with a protective value many times that which has been reported in the literature. In fact, the antibody content of the serum of some superior animals even approximates the value of serum produced in horses.

SUMMARY

From experiments made in order to produce high value anti-tetanus serum in cattle the following conclusions may be drawn.

1. Serum of higher antitoxic level can be produced in older (over 7 years of age) cattle rather than in younger animals.

2. Lean, motile animals are better serum producers than heavy ones inclined to put on fat.

3. Natural antitoxic content of blood serum does not yet promise production of high value serum.

4. No correlation exists between the degree of the immune response elicited by the first inoculation and the subsequent antitoxin content of the serum.

5. 3 inoculations are necessary for maintaining the titre in the blood serum.

6. With two injections of alum-precipitated toxin of 200 ml each in an interval of 8 days, a serum of equal value can be obtained as with non-precipitated toxin administered three times in doses of 300, 400, and 500 ml.

7. A correlation was established to exist between the quantity of the toxin (MLD value) employed and the antigenic effect. A toxin with over 500,000 MLD is the one most suitable for hyperimmunization of cattle.

8. The antigenic value of a toxin whose toxicity has deteriorated during storing also decreases.

9. If for the triple inoculation a toxin of high toxicity is always freshly prepared a serum of higher protective value can be produced than after three inoculations with the same toxin.

10. Along with the increase in the quantity of antigen, the antitoxin content of the blood serum also increases.

11. The highest antibody content in the blood serum is reached after varying periods following inoculations. The best time for withdrawing blood is generally the 13th day following the first inoculation.

LITERATURE

1. *Archipow, K. S.:* Zbl. f. Bakt. Orig. 118 (1930).
2. *Becker, M.:* Exp. Vet. Med. 5 (1951).
3. *Buer, A. W.:* Acta Path. Scand. 23 (1946).
4. *Condrea, P., Poenaru, H., Dima, G.:* C. r. Soc. Biol. 125 (1937).
5. *Eisler, M.* u. *Löwenstein, E.:* Zbl. f. Bakt. Orig. 61 (1912).
6. *Eisler, M.:* Wien. klin. Wchschr. (1915).
7. *Glenny, A. T.:* J. Path. and Bact. 28 (1925).
8. *Kraus, R., Cuenca, B., Sordelli, A.:* Münch. Med. Wchschr. 68 (1921).
9. *Kraus, R.:* Wien. klin. Wchschr. 67 (1923).
10. *Kemény, L., Illés, E., Szotáczky, I.:* Acta Vet. Hung. 3 (1953).
11. *Kolle, W., Kraus, R., Uhlenhuth, P.:* Handbuch der Path. Mikroorg. (1928).
12. *Löwenstein, E.:* Ztschr. f. Hyg. 62 (1909).
13. *Lemetayer, E., Nicol, L., Girard, O., Corvarzier, R.:* C. r. Soc. Biol. 143 (1949).
14. *Lemetayer, E., Nicol, L., Girard, O., Corvarzier, R., Chreyroux M.:* Rev. Med. Vet. Ecole d'Alfort 125 (1949).
15. *Ramon, G., Lemetayer, E.:* C. r. Soc. Biol. 116 (1934).
16. *Ramon, G., Lemetayer, E.:* Rev. d'Immun. 1 (1935).
17. *Ramon, G., Lemetayer, E., Mustafa, H.:* C. r. Soc. Biol. 124 (1937).
18. *Ramon, G., Lemetayer, E., Richou, R.:* C. r. Soc. Biol. 124 (1937).
19. *Römer, P. H.:* Ztschr. f. Immunitätsforsch. 1 (1908).
20. *Römer, P. H.* u. *Sames, Th.:* Ztschr. f. Immunitätsforsch. 4 (1910).
21. *Schmidt, H.:* Grundlage der Spezifischen Therapie, Berlin (1940).
22. *Schneider, L.:* I. Hungarian Microbiological Congress, Budapest (1952).
23. *Вержиковский, Н.А.:* Руководство по сывороточному и вакцинному делу Москва (1943).

ДАННЫЕ К ПРОИЗВОДСТВУ ПРОТИВОСТОЛБНЯЧНОЙ СЫВОРОТКИ У РОГАТОГО СКОТА

П. Олах

Резюме

Автор производил эксперименты по исследованию факторов, дающих возможность изготовления противостолбнячных сывороток более эффективных, чем применяемые до сих пор. Установлено, что от животных более старшего возраста (свыше 7 лет), обладающих живым темпераментом, получаются более эффективные сыворотки, чем от молодых, поддающихся ожирению особей с вялым организмом. В кровяной сыворотке приблизительно 10% подопытных животных был обнаружен натуральный антитоксин. Содержание натурального антитоксина, однако — в противоположность мнению многих авторов — не является доказательством возможности производства высокоэффективных сывороток ввиду того, что образование антитоксина усиливалось только после первой прививки, а при последующих прививках разница эта прекращалась. Не было также взаимосвязи между степенью основного иммунитета и максимальным титром противотел в сыворотках после окончания гипериммунизации. Автор установил, что для достижения максимального титра противотел в кровяных сыворотках необходимы три прививки повышающейся дозой токсина с интервалами по пятб дней, и что такой же эффективности сыворотку можно получить в результате двух прививок адсорбированного к $Al(OH)_3$ токсина в одинаковой дозе по 100 см³ с 8-ми дневным интервалом. Возможно определение зависимости между значением **MLD** токсина и действием антигена, однако, зависимость эта не является линеарной, так как содержание противотел не повышается пропорционально значению **OLM**. Для гипериммунизации рогатого скота наиболее подходящим оказался токсин с ценностью в 500 000 **OLM** и свыше. В результате длительного хранения токсина снижается его токсическое действие. Наряду с уменьшением токсичности понижается и эффективность антигена, ввиду чего для гипериммунизации должен применяться токсин не старше 72 часов. С повышением дозы антигена повышается антитоксический титр кровяных сывороток. После окончания прививок максимальный титр кровяных сывороток наблюдается в различное время, в зависимости от индивидуальности особей. Обычно оптимальным сроком взятия крови является 13 день после первой прививки.

THE ANTIGENIC STRUCTURE OF INFLUENZA VIRUS AS STUDIED BY A SIMPLE IMMUNE SERUM ABSORPTION TEST

By

GY. TAKÁTSY and J. FÜRÉSZ

State Institute for Public Health, Budapest

(Received January 30, 1954)

A new simple immune serum absorption test, well suited for studying the antigenic composition of influenza viruses, has been described in a previous paper [1]. In the same paper an account has been given of experiments aimed at determining the quantitative relationships of antigen-antibody union, i. e. what amounts of antibody in the homologous serum are absorbed by a given strain of influenza virus under various conditions. In the present paper the laws governing heterologous absorption and investigations into the antigenic structure of influenza virus are described.

To study the antigenic composition is one of the most important tasks in research work on influenza virus. The viruses of influenza are notable for the extent of antigenic variation and, consequently, demonstration of antigenic differences between strains is not only of theoretical significance, but is of obvious importance in both epidemiology and prophylaxis. Ever since the virus of influenza was discovered, innumerable attempts have been made by means of different methods to determine the antigenic spectrum of individual strains. It is, however, only the immune serum absorption test that makes the precise demonstration of antigenic components possible. Although its extensive adoption by research workers has been hindered by difficulties in technique, this method lends itself for the preparation of an immune serum which, after the removal of antibodies reacting with heterologous strains, contains only the antibodies most peculiar to the given strain. *Friedewald* [2] demonstrated by cross-absorption tests fine differences among influenza A strains. More accurate and extensive investigations were conducted in this field by *Hirst* [3] who prepared rabbit antisera against influenza A strains and obtained by absorption with a number of strains so-called type-specific sera which could be used for the demonstration of antigenic components. More recently, *Jensen and Francis* [4] absorbed ferret sera with virus adsorbed onto human erythrocytes and claimed that the influenza A strains are composed of a great number of antigenic components. According to these authors, the various strains would differ only in that they contain the same antigenic components in different proportions. Similar

antibody tests employing virus bound to erythrocytes have been reported by *Fiset* and *Donald* [5].

By our method simpler than those described by the above authors [3, 4, 5] strain specific sera were prepared from A-prime antisera and were used in studies on the antigenic structure of various strains of influenza virus.

Material and Methods

Virus Strains. The following strains, foreign and Hungarian, were selected for examination: PR8, Talmey, Melbourne, FM1, Paris PL 1/49, Sweden 3/50, England 1/51 (Liverpool), Budapest 4/49, 2/51, 3/51, 6/51, 7/51, 10/51, 1/52, 2/52, 3/52, 5/52, 6/52, 12/53.

Red Cells. Chicken red cells, taken with sodium citrate and washed four times in physiological saline, were used.

Immune Sera. All immune sera were prepared in chickens, 8- to 10-week- old, by inoculating 1 ml of allantoic fluid virus, followed by another 1 ml dose 5 days later. On the tenth day following the first inoculation the fowls were sacrificed by bleeding and the sera stored at − 6°C.

Haemagglutination (HA) and Haemagglutination Inhibition (HI) Tests by the Spiral Loop Methode (Figs 3c, 3d.).

The serial dilutions were made in cups drilled into plexiglass plates, with the aid of the spiral loop already described [6]. The loop is made of heat-resistant, elastic chromenickel wire and is so formed that the volume of fluid taken up is only negligibly influenced by surface tension. Thus, if once calibrated on an analytical scale, the loop will measure microvolumes with a reasonable degree of consistency and accuracy (limits of error, ± 2 per cent). A calibrated instillator, releasing drops of 0,025 ml of physiological salt solution, was used for measuring fluids.

In informative HA titrations, 0,05 ml of a 0,5 per cent chicken red cell suspension were measured into each cup on the plexiglass plate and serial dilutions were carried out with a spiral loop of 0,025 ml capacity. By means of setting up another titration series with a first dilution of 1:5, instead of the 1:3 dilution in the former series, the end titres could be determined accurately.

In HI tests two dilution series were made in 0,025 ml of physiological saline with the aid of the 0,025 ml loop and then 0,025 ml of the virus suspension containing 4 HI units of virus were added. After 15 minutes at room temperature, 0,025 ml of a 1 per cent chick red cell suspension were added and the complex was mixed. Readings were taken after 20 minutes.

Units of Virus and Antibody. In order to make numerical presentation possible, arbitrary units for virus and antibody have been established. One virus unit (V) is contained in each 0,025 ml of a suspension which, when tested by the given method, will show partial (++) HA. One antibody unit (A) is contained in each 0,025 ml of that dilution of serum, which, when mixed with 4 units of virus by the given method, will give partial (++) HI. The A and V values in the text and in the tables mean the number of antibody or virus units contained in 0,025 ml of the serum-virus mixture employed in the absorption test. The 0,025 ml volume was chosen since both the HA and HI tests were carried out with such volumes.

Preparation of Virus. The strains used were inoculated into the allantoic sac of 11-day old chick embryos. Allantoic fluid was harvested after incubation for 48 hours at + 35°C and subsequently chilling for 3 hours at 4°C. The method of preparing the virus has been described in detail [7,8]. The virus-bearing allantoic fluid was purified by red cell adsorption and elution. The eluate was diluted with distilled water to reduce the concentration of NaCl to 0,2 per cent, causing the virus to precipitate. After the precipitated virus was centrifuged at 3000 r. p. m. for 30 minutes, it was resuspended in physiological saline of 1/200 the original volume and centrifuged again at 3000 r. p. m. for 30 minutes. The supernatant then contained the purified and concentrated virus. After adding minute amounts of penicillin and streptomycin to them, the virus preparations were stored at + 4°C. The preparations displayed a HA titre of 1:100,000 to 1:200,000 stable for several months.

Antibody Absorption Tests

To sera undiluted or diluted to 1:2, an equal volume of that dilution of virus was added, which had been found the best in preliminary titration. (See under »Experimental«). The mixture

was incubated at 37°C for 20 minutes with shaking at intervals. The virus-antibody union is accompanied by agglutination. [8]. The resulting precipitate was centrifuged at 3000 r. p. m. for 15 minutes and the supernatant was tested for HI titre.

Experimental

Absorption of Immune Sera with Heterologous Strains. The quantitative relationships of heterologous absorption were studied by cross-testing two antigenically closely related strains of the influenza A-prime group, Paris PL 1/49 and England 1/51 (Liverpool) (Lp). The Lp virus preparation

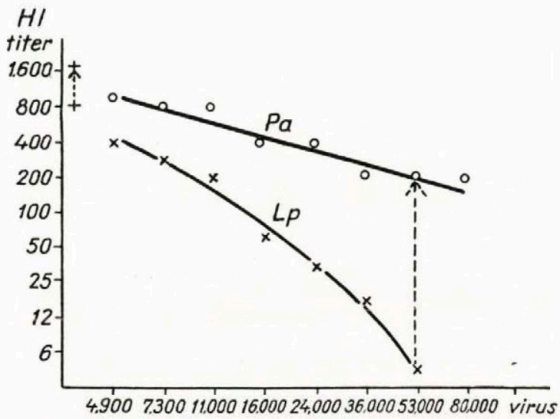


Fig. 1. Homologous (Pa) and heterologous (Lp) HI titres of Paris antiserum absorbed with various amounts of Liverpool virus. Abscissa, absorbing virus units. Ordinate, HI titre of the absorbed serum.
+ homologous and heterologous titre of the unabsorbed serum

containing 120,000 V per 0,025 ml was serially diluted in steps of 1 : 1,5 and to each dilution an equal volume of Paris immune serum of a 1 : 1,600 HI titre was added. After 20 minutes at 37°C and centrifugation at 3,000 r. p. m. for 15 minutes, the supernatants were tested for HA and HI titres. Antibody absorption by various amounts of virus are illustrated by the two divergent curves in Fig. 1.

The antibody reacting with the absorbing strain was completely removed from the serum by 53,000 V of Lp virus, but a high level of homologous antibody still remained. The lengths of the arrows in Fig. 1 indicate the difference between homologous and heterologous titres, prior to and after absorption. This difference was one tube with the unabsorbed serum and was as much as 6 tubes after the removal of all antibody inhibiting the Lp virus. In other words in this respect the use of absorbed serum has increased the sensitivity of the

HI test six times. This increase of sensitivity was even more conspicuous when in the experiment shown in Fig. 2 Lp serum was absorbed with the Paris strain. Prior to absorption the heterologous and homologous titres of the serum were identical. After absorption with 24,000 V a difference of 4½ tubes was demonstrable. Cross-testing with unabsorbed sera showed a difference of 1 tube (Paris serum 1, Lp serum 0), while with absorbed sera the difference rose to 10½ tubes (6 + 4½). To eliminate the fractions, *Dömök et al.* [9] multiply the tube values by four and the index number so obtained they call »d« (difference) value. According to these authors, a »d« value higher than 5 is only indicative of a significant difference between two strains.

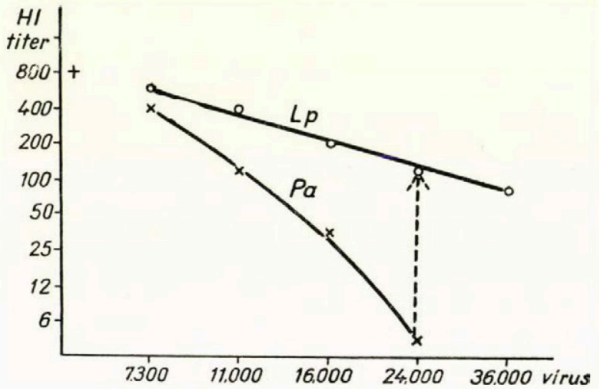


Fig. 2. Homologous (Lp) and heterologous (Pa) HI titres of Liverpool antiserum absorbed with various amounts of Paris virus. Abscissa, absorbing virus units. Ordinate, HI titre of the absorbed serum.
+ homologous and heterologous titre of the unabsorbed serum

The example of four closely related A-prime strains shown in Table I clearly illustrates how much higher the «d» values are when the strains are cross-tested with absorbed sera, instead of unabsorbed ones. In the former case the values are about 10 times higher than in the latter.

It is important to determine the quantity of virus to be used in order completely to absorb a certain quantity of antibody. This problem is of both methodical and theoretical interest. If more virus is added to the serum than is required for complete removal of the antibody present, the virus haemagglutinin in excess interferes with further HI tests, and may absorb antibodies for which it is not specific. There is yet another aspect of the problem. It has been found, as will be discussed below, that antigenic differences between strains are less conspicuous when an excess of virus is used.

These considerations led us to work out a rapid and reliable micro-method for titrating the *»optimum« amount of virus capable of completely absorbing a given antibody from a given serum, without free virus being left over.* This is car-

TABLE I

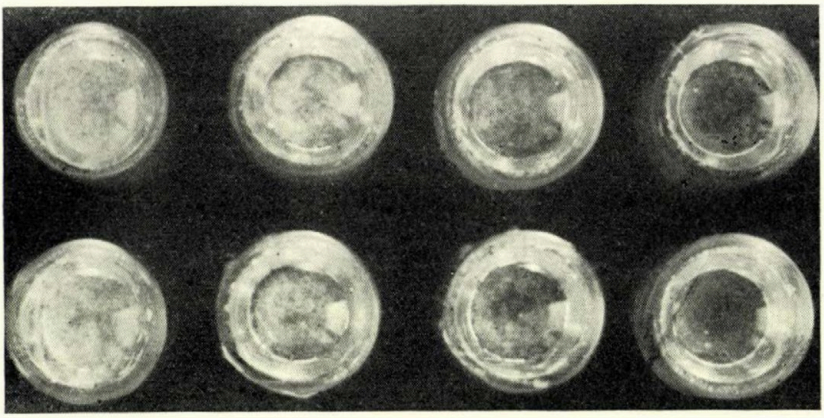
»d« values, as determined in cross-HI tests with absorbed and unabsorbed sera

Strains	»d« values with sera	
	unabsorbed	absorbed
Pa — Sw	11	37
Pa —Lp	4	20
Pa — 7/51	5	28
Sw — Lp	2	16
Sw — 7/51	1	12
Lp — 7/51	1	10

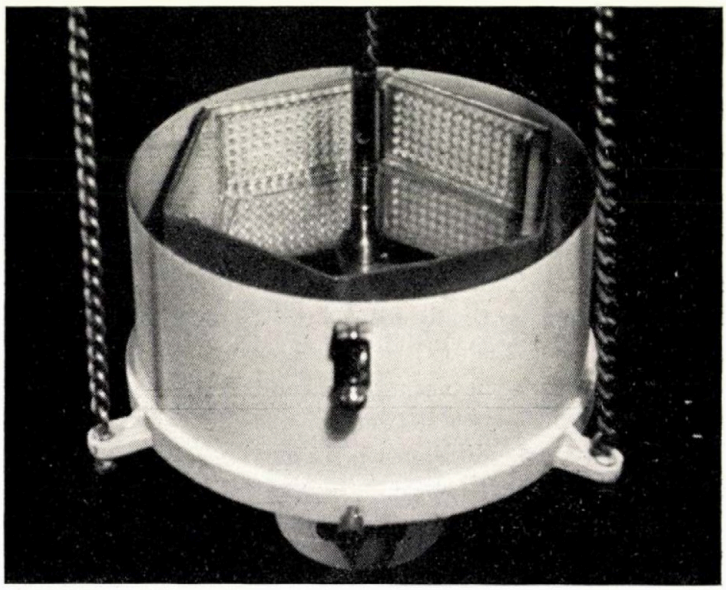
ried out as a preliminary procedure, in the following way. 0,05 ml volumes of the virus in question are serially diluted on a plexiglass plate in steps of 1 : 1,5, with a spiral loop. To each sample of virus 0.05 ml of the immune serum diluted at a ratio of 1 : 2 are added. The mixture is vigorously shaken and incubated at 37°C for 20 minutes. The virus-antibody complex resulting from the virus agglutination visible to the naked eye (Fig. 3 a), is centrifuged at low speed in a specially devised centrifuge (Fig. 3 b), into which the plexiglass plate can be placed. The supernatants are then tested for HA and HI titres (Figs. 3 c, 3 d).

The results of such a preliminary titration are shown in Table II.

As seen in Table II, 25,000 V are required for completely removing all the antibody reacting with the Sweden virus from the Lp serum, which then contains 32 A homologous antibody and no free virus. Similarly, there is an »optimum« amount of virus (33,000 V) for absorbing from Sweden serum nearly all the antibody reacting with the Lp strain (Table III). The experimental data show a demonstrable difference between the two strains, irrespective of the serum used. In Lp serum the difference is the most marked with absorption with 25,000 V. In this case the serum contains neither antibodies reacting with absorbing virus, nor free virus. With the Sweden serum the most marked difference will be obtained when a dose of virus is applied, which leaves some (8 A) of the antibody unabsorbed reacting with the absorbing strain. On larger doses of virus the difference becomes less in both sera. If, for instance, the sera are absorbed with 50,000 V of heterologous strain, that is with an amount far in excess of the »optimum«, and the free virus is eliminated by ultracentrifugation and treatment with heat, there remain 16 A homologous antibody in the Lp serum and none in the Sweden serum.

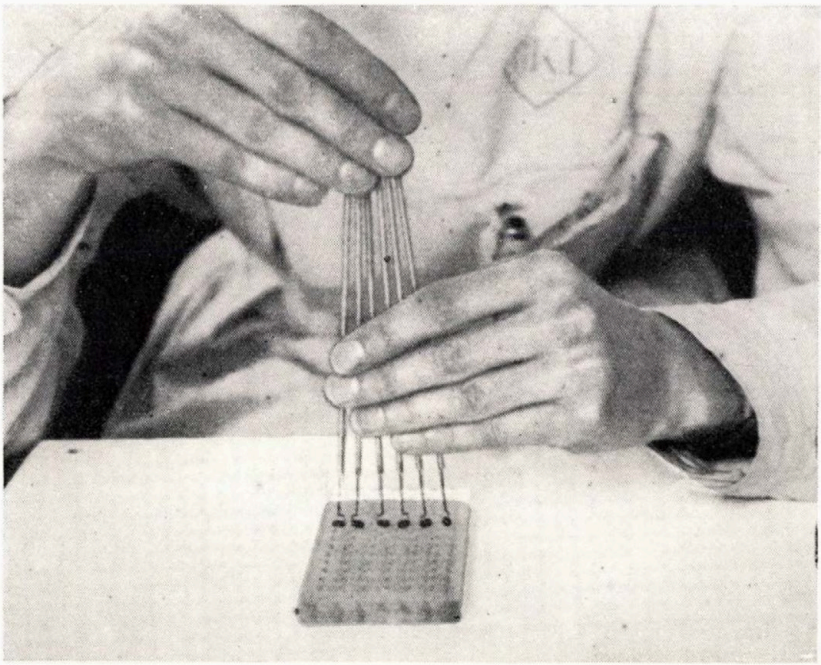


a. Micro-absorption test in cups of plexiglass plate. The specific virusagglutination is distinctly visibile in the individual samples

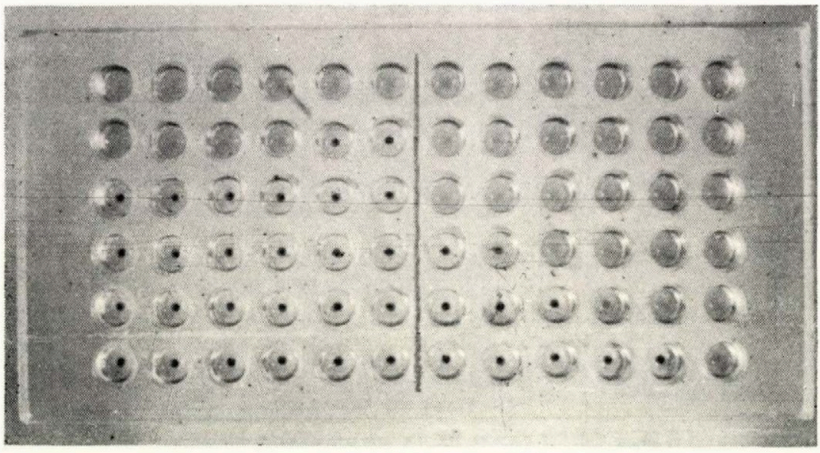


b. Centrifuge for plexiglass plates

Fig. 3 a-d. **Titration of the »optimum« amount of virus**



c. Simultaneous serial dilution of 6 serum samples in the cups of a plexiglass plate, by means of spiral loops



d. Testing of the supernatants of samples shown in Fig. 3a. *On the left* HA, *on the right* HI titration. Supernatant 3 (row 3) contains neither free virus (left), nor antibody residue (right). It is absorbed with the »optimum« amount of virus

TABLE II

Determination of the «optimum» amount of virus
Liverpool serum absorbed with Sweden virus

Sweden virus (V)	Antibody (A) tested after absorption with		Free virus (V)
	Sweden	Liverpool	
	virus		
nil	128	256	—
50,000	0	16	2000*
33,000	n. t.	n. t.	128
25,000	0	32	0
16,500	2	48	0
12,500	4	48	0
8,250	10	96	0
6,250	20	96	0
4,125	40	182	0

* = free virus removed by ultracentrifugation.
n. t. = not tested.

TABLE III

Absorption of Sweden serum with variable amounts of Liverpool virus

Lp Virus (V)	Antibody units (A) tested with		Free virus (V)
	Lp	Sw	
	virus, after absorption		
nil	256	256	—
66,000	n. t.	n. t.	20,000
50,000	0	0	6,000*
33,000	2	6	0
25,000	8	48	0
16,500	32	96	0
12,500	48	128	0
8,250	192	256	0
6,250	192	256	0
4,125	256	256	0

* = Free virus removed by ultracentrifugation.
n. t. = not tested.

Examination of Antigenic Structure with Strainspecific Sera. The above described antibody absorption method was used for preparing strain-specific sera from the immune sera of the following foreign and Hungarian strains isolated in recent years: FMl, Paris PL 1/49, Budapest 4/49, Sweden 3/50, England 1/51 (Lp), Budapest 7/51.

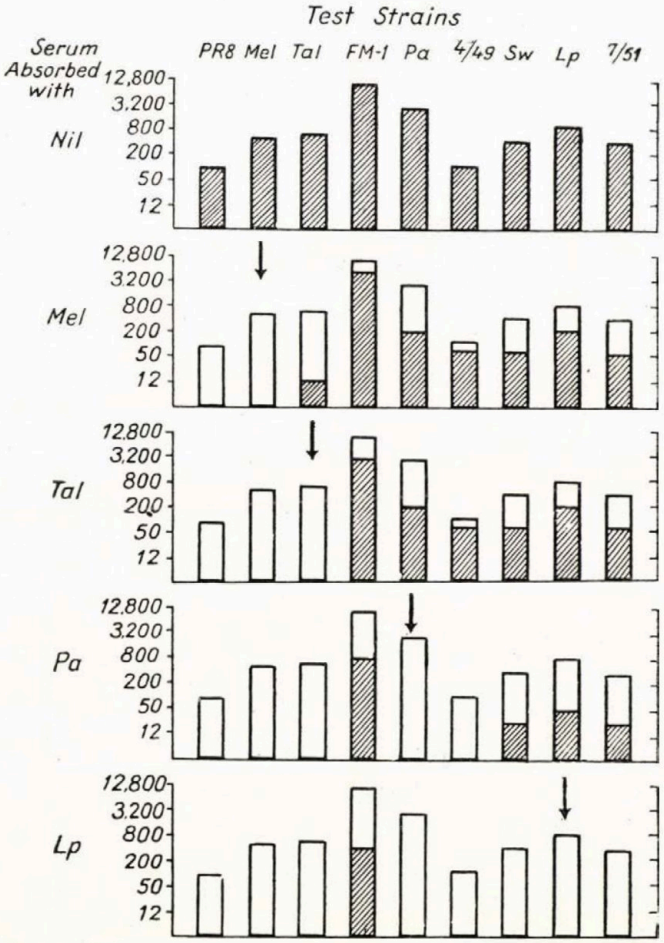


Fig. 4. Absorption of FMl serum with heterologous (Melbourne, Talmey, Paris and Liverpool) strains.
The height of the columns show the titres of the unabsorbed serum, shaded parts represent residual antibody titres

The sera absorbed with one or more heterologous strains reacted only with the homologous one, or in some instances also with some closely related strains from those at our disposal.

The method used for preparing strain-specific sera is illustrated by describing the procedure used with the FMl strain (Fig. 4).

Undiluted sera were absorbed; the amount of viruses to be used was determined by preliminary titration. To start with, A antibodies were removed from the serum first with Melbourne and then with Talmey strain. The serum

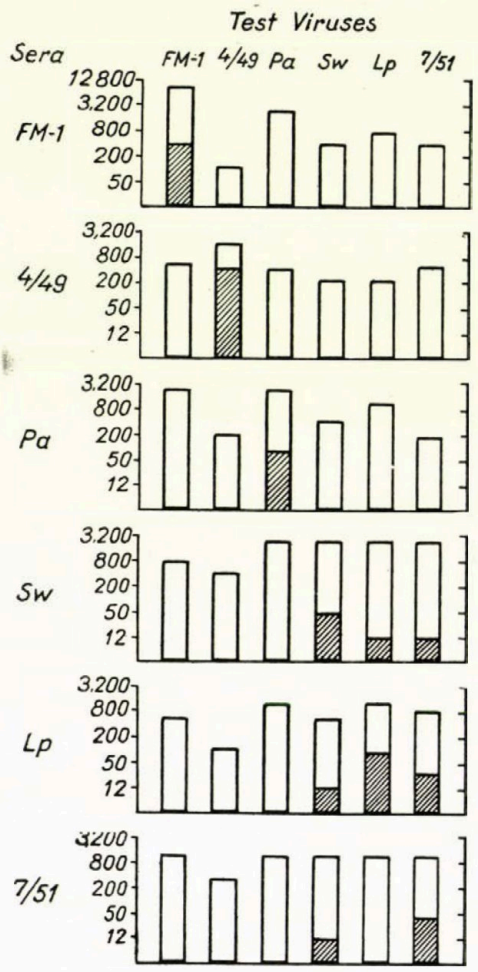


Fig. 5. HI titres of strain-specific sera.
The height of the columns show the titres of the unabsorbed sera, shaded parts represent residual antibody titres. The following absorptions were carried out, FMl serum with Melbourne, Talmey, Paris and Liverpool; 4/49 serum with Paris, Sweden and Liverpool; Paris serum with FMl and Liverpool; Sweden serum with Paris and Liverpool; Liverpool serum with Paris; 7/51 serum with FMl and Liverpool strains

so absorbed was A-prime specific, reacting only with A-prime strains. Next the heterologous A-prime titres were absorbed, first with the Paris, then with the Lp strain. After this the serum contained no antibodies but such as reacted exclusively with the FMl strain.

Preparation of other strain-specific sera was based on the same principles.

The Hungarian strains isolated in the years from 1951 to 1953 [10] were tested against the strain-specific sera for specific antigenic components of earlier strains.

TABLE IV

Examination of the antigenic structure of influenza A-prime strains by testing with strain-specific sera

Designation of strain	Isolation		Strain-specific sera					
	year	site	FM1	4/49	Pa	Sw	Lp	7/51
FM1	1947	U. S. A.	28	—	—	—	—	—
4/49	1949	Budapest	—	28	—	—	—	—
Pa	1949	Paris	—	—	18	—	—	—
Sw	1950	Sweden	—	—	—	15	8	8
Lp	1951	Liverpool	—	—	—	10	20	—
7/51	1951	Budapest	—	—	—	10	10	14
2/51	1951	Budapest	—	8	—	14	19	12
3/51	1951	Budapest	—	4	—	6	17	10
6/51	1951	Budapest	—	4	—	2	15	4
10/51	1951	Fejér county	—	12	—	—	—	—
1/52	1952	Szolnok county	—	—	—	—	10	8
2/52	1952	Szolnok county	—	10	—	—	4	4
3/52	1952	Szolnok county	—	4	—	6	11	8
5/52	1952	Vas county	—	—	—	11	18	10
6/52	1952	Budapest	—	—	—	6	3	4
12/53	1953	Budapest	—	—	—	—	18	—

The figures in Table IV are proportionate to the logarithm of the serum titres. Values lower than four are not significant. It was striking that the strain-specific sera FM1 (1947) and Paris (1949) reacted with none of the Hungarian strains, while the specific antigen of our Bp 4/49 (1949) strain was more or less detectable in the strains dating from 1951—52. Of the 1951 strains, the one designated 2/51 contains antigenic components of the Lp strain in the first place, and also of strains Sweden, Budapest 7/51 and Budapest 4/49. Strain 3/51 is similar in nature, but contains less Budapest 4/49 and Sweden antigens. Strains 6/51 and 10/51 are more different. Strain 6/51 contains mainly Lp antigenic components and only negligible proportions of Budapest 4/49, Sweden and Budapest 7/51 antigens, while strain 10/51 contains only Budapest 4/49 antigen from among those tested. In the strains isolated in 1952 the characteristics of the Lp strain predominate with the exception of strain 2/52, which contains Budapest 4/49 antigen, and strain 6/52, which contains only negligible pro-

portions or none of the antigenic components mentioned. The single A-prime strain isolated early in 1953* was definitely of the Lp type as to antigenic structure.

Discussion

The immune serum absorption test has not extensively been used for examining the antigenic structure of influenza viruses, owing mainly to technical difficulties. These difficulties have been discussed in detail in a previous study [1]. The great amounts of virus needed for the test were prepared by repeated ultracentrifugation by *Friedewald* [2], *Walker* and *Horsfall* [11], and more recently by *Hirst* [3], and the same method was used for the removal of the virus-antibody complex and of the free virus. *Kożinsky* [12], and more recently *Jensen* and *Francis* [4], as well as *Fiset* and *Donald* [5] make the virus to adsorb onto red cells instead of ultracentrifugation. Their preparations, are, however, not concentrated enough to be used for testing against undiluted sera.

In unpublished experiments we adsorbed the virus onto animal or natural gas charcoal as a preliminary procedure. In comparison with adsorption onto red cells, this method was more efficacious and the preparations could be used for completely absorbing even undiluted sera. In spite of this, the method has not been used in further work, owing in the first place to the nonspecific absorption of the charcoal virus preparation. In our opinion nonspecific substances not participating directly in the reaction may also interfere with the specific antibody absorption by absorbing antibodies or by inhibiting haemagglutination. Red cells are not more desirable from this respect than other substances used as adsorbents.

In addition to the fact that it does not require ultracentrifugation, our method has the advantage of being applicable to undiluted sera, the virus preparation involved being highly concentrated [7, 8]. Other advantages of the method have been described previously [1]. Suffice here to point out that rapid and reasonably accurate tests can be carried out with very small volumes. For instance, the preliminary titration of the »optimum« amount of virus requires not more than 0,05 ml of the virus preparation and 0,05 ml of serum for each sample of the titration series. The preliminary determination of this optimum amount of virus preparation is useful not only because in possession of this information the absorption test in question may be reproduced on any scale, but also because it helps to avoid the undesirable effects of free virus.

Investigations into the antigenic structure of influenza virus strains have failed so far to lead to an unequivocal standpoint. The antibody absorption test, undoubtedly the best known method of antigen analysis, has its limitations,

* Early in 1953 a B-type influenza epidemic occurred in Hungary.

inasmuch as it is reliable only if specific antibodies are produced by the immunized organism in quantitative and qualitative proportions to the antigenic components. The antibody spectrum, being influenced by the method of immunization, species of animal, etc., is not always the true reflexion of the antigenic spectrum. Under such circumstances detailed analysis of the antibody and of the *antigen* itself is the only means by which the antigenic structure of the influenza virus will be determinable.

Hirst [3] prepared type-specific sera by absorption with a number of strains and divided the antigens of influenza A viruses into two categories, group-specific antigens conveying the A character and type-specific antigens peculiar to certain groups of strains. *Jensen* and *Francis* [4] distinguish at least 18 antigenic components of the influenza A strains. They selected 17 strains reacting only with the homologous strain-specific serum. The immune sera of these 17 strains were pooled in such proportions that they gave approximately identical titres against each of the strains. This serum mixture was absorbed with one of the strains and the decrease of HI titres against the rest of the strains was used for drawing conclusions as to the antigenic structure of the absorbing strain. On this basis, *Jensen* and *Francis* have arrived at the conclusion that individual strains contain the same antigens but in different proportions. One of the disadvantages of that method, admitted by the authors themselves, is that absorption from such a serum mixture is not specific enough, since the Lee virus may also absorb antibodies from pooled A sera. Further the antigenic structure demonstrable by the method may differ from the real structure. Illustrative of this is an example taken from the paper by *Jensen* and *Francis*. In their Fig. 4 it is shown that it was possible to remove by absorption with the Rhodes 1947 A-prime strain 3/4 of the Swine antibody present in the pooled serum-mixture. However, in this mixture only a small proportion of the antibody, named »Swine«, originates from the Swine serum itself, its major part originating from the other 16 sera, which also inhibit the Swine virus in its haemagglutinating action. Consequently, the Rhodes strain has absorbed not so much the antibodies of the Swine serum, but rather those antibodies of the other sera which react also with the Swine strain. This is the more probable, as the latter are more closely related to the Rhodes strain than are the real Swine antibodies. Thus, the above mentioned absorption fails to prove that the Rhodes strain actually contains the antigen represented by the Swine virus.

On the basis of the literary data cited, it is doubtless that type-specific or strain-specific sera may be produced from the different influenza A immune sera. Such sera contain only one kind of antibody, that kind whose corresponding antigen is present in the homologous strain and in the closely related ones, but not in the other strains. As our examinations have shown, the same is valid for A-prime strains, except for the fact, that these strains differ less markedly from each other than A strains. Therefore, to facilitate the demonstration of

differences between these strains the sensitivity of the test must be increased, if it is endeavoured to classify A-prime strains according to types. This, however, was not the purpose of the experiments, as we had but a few foreign strains at our disposal. Our purpose was to examine, by means of antibody absorption tests, strains shown by cross-HI testing to be closely related or identical, for specific antigenic components peculiar to one or another of them and to identify the antigens reacting with the strain-specific sera. The influenza A-prime strains isolated in the years from 1951 to 1953 in this Institute [9, 10] were tested against strain-specific sera. On the basis of this experience it became possible to gain information as early as after the first passage about the antigenic structure of strains isolated during the influenza A-prime epidemic occurring at the end of the year 1953. Of course, the method cannot be used for demonstrating formerly unknown antigenic components. For this purpose, strain-specific serum must be prepared against the newly isolated strain.

It is interesting that the A-prime strains isolated in Hungary from 1951 to 1953 do not react with the FM1 and Paris strain-specific sera, but in many of them the antigen characteristic of strain Budapest 4/49 is clearly distinguishable. This observation appears to indicate that in a given geographical area the origin of new strains is to be sought mainly in strains that occurred there previously. This does not exclude, of course, potential invasion from other areas, the importance of which we do not want to minimize. On the contrary, strains carried in from distant areas may represent a serious epidemiological problem, their antigenic structure being substantially different from that of the endemic strains.

The experimental evidence obtained confirm the data of *Hirst* according to which new strains may possess antigenic components not included in the antigenic structures peculiar to earlier strains, while some antigenic components which could be indentified earlier are not demonstrable in the new strains. In addition, differences among strains as determined with the cross-HI test will be the more marked the longer the time elapsed between the isolation of the strains compared. On the basis of all these, we are of the opinion that *the high variability of the antigenic pattern of influenza viruses is not due to a variation of antigenic components already present, but rather to the appearance of new, and the gradual disappearance of old, antigenic components.*

In addition to its theoretical importance, the study of the antigenic structure may yield significant data, particularly in the field of specific prophylaxis. The choice of the most effective strains for immunisation may be all-important. On the basis of the above theoretical considerations and experimental evidence it appears reasonable to suggest that the vaccine be prepared from the most recently isolated strains, since the protection offered by earlier A strains against new ones is rather questionable. However, the *cause* of the changes in antigenic structure will have to be found and a deeper insight into the interrelations be-

tween the biological properties and antigens of the virus will have to be gained before the problem is considered as solved.

SUMMARY

The mechanism of heterologous influenza virus-antibody union was studied in immune serum cross-absorption tests performed by means of a simple and rapid procedure described in a previous paper [1].

Antigenic differences between influenza A-prime strains are demonstrable with the highest degree of sensitivity when the antibody absorption test is carried out with an »optimum« amount of virus which completely absorbs the antibody reacting with the absorbing strain, without leaving any residue of free virus. This »optimum« virus concentration was determined by a rapid and accurate micro-titration method.

By absorption with a number of heterologous A-prime strains, strain-specific sera were prepared. These were used for examining the antigenic spectrum of A-prime strains isolated in Hungary during recent years.

On the basis of the experimental evidence obtained the antigenic structure of the influenza virus is discussed.

LITERATURE

1. *Takátsy, Gy., Fürész, J., Farkas, E.:* Acta Physiol. Hung. **5,** 241 (1954).
2. *Friedewald, W. F.:* J. Exp. Med. **79,** 633 (1944).
3. *Hirst, G. K.:* J. Exp. Med. **96,** 589 (1952).
4. *Jensen, K. E., Francis, Th., Jr.:* J. Exp. Med. **98,** 619 (1953).
5. *Fiset, P.* and *Donald, H. B.:* Brit. J. Exp. Path. **34,** 616 (1953).
6. *Takátsy, Gy.:* Kísérletes Orvostudomány **2,** 393 (1950) and *ibid.* **4,** 60 (1952).
7. *Takátsy, Gy.:* Acta Med. Hung. **3,** 185 (1952).
8. *Takátsy, Gy.:* Acta Microbiol. Hung. **1,** 35 (1954).
9. *Dömök, I., Szafir, É., Farkas, E.:* Acta Microbiol. Hung. **1,** 99 (1954).
10. *Farkas, E., Dömök, I.:* Acta Microbiol. Hung. **1,** 471 (1954).
11. *Walker, D. L.* and *Horsfall, F. L., Jr.:* J. Exp. Med. **91,** 65 (1950).
12. *Kozinski, A. W.:* Med. Dosw. i Mikrob. **3,** 77 (1951).

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИГЕННОЙ СТРУКТУРЫ ВИРУСА ГРИППА ПРОСТЫМ МЕТОДОМ ИСТОЩЕНИЯ ИММУННЫХ СЫВОРОТОК

Дь. Такачи и *Я. Фюрес*

Резюме

Авторы, опубликованным ими ранее простым и скорым методом истощения иммунных сывороток, исследовали механизм связывания гетерологичного гриппозного вируса и антител в перекрестных реакциях истощения иммунных сывороток. Различие между антигенами гриппозных штаммов типа A' наиболее ярко выражаются в том случае, когда при постановке реакции истощения иммунных сывороток применяется такое »оптимальное« количество вирусов, которое полностью связывает реагирующие с истощающим штаммом противотела без появления свободных вирусов. С целью определения »оптимального« количества вирусов авторы разработали быстрый и точный метод микротитрования, для проведения которого требуется не более 0,05 мл. вирусного препарата, а для каждой пробы титровальной серии только 0,05 мл. сыворотки.

Путем истощения несколькими гетерологичными гриппозными штаммами типа A' авторы приготовили штаммспецифические сыворотки, с помощью которых исследовали антигенный спектр выделенных за последние годы в Венгрии штаммов A'. Установили, что упомянутые штаммы не реагируют со штаммспецифическими сыворотками изолированных заграницей штаммов FMl и Paris, штаммспецифическая сыворотка штамма Budapest 4/49, выделенного одновременно с заграничными штаммами, дает значительный титр со многими изолированными с тех пор отечественными штаммами.

Исходя из проведенных опытов, авторы считают, что большая изменчивость антигенов вируса гриппа не является варьированием имеющихся частиц антигена, а происходит путем появления новых и постепенного исчезания старых частиц антигена.

THE INFLUENZA VIRUS ADSORBING CAPACITY OF THE VASCULAR ENDOTHELIUM OF VARIOUS MAMMALS

By
G. IVÁNOVICS, S. HORVÁTH and E. SZÖLLÖSY

Institute of Microbiology, University Medical School, Szeged

(Received February 22, 1954)

Haemagglutination caused by influenza and related viruses is inhibited in a significant degree by tissue extracts and body fluids. As regards the details of this problem, we refer to the works by *Burnet* [1, 2, 3] as well as to studies published by *Anderson* [4], *Bieling* and *Oelrichs* [5]. Not only erythrocytes, but also other tissues possess virus adsorbing capacity. Mitochondria isolated from hepatic cells bind the virus of influenza [6]. Of a virus introduced into the excised lung of mammals, considerable amounts are adsorbed by the pulmonary epithelium [7, 8, 9]. This latter phenomenon is equally observable in animal species not susceptible to the virus [9].

We have, however, been unable to find data in the literature to decide whether the vascular endothelium is capable of adsorbing virus. It has been thought that the problem could adequately be studied in organs removed from the body and perfused with influenza virus material. The experimental procedure adopted for this purpose was essentially the following. Under anaesthesia, the vena portae of the animal was cannulated. Subsequently the liver, carefully perfused with saline, was removed from the abdominal cavity and a suspension of virus of known titre was circulated in the blood vessels. The observations made in the course of these investigations are the subject matter of the present paper.

Material and Methods

Virus material. Allantoic fluid from infected chick embryos was used. In cases where virus was titrated by the haemagglutination method only, fresh, not more than two weeks old, allantoic fluid stored in the frozen state at — 20°C was employed. In cases where the reduction of infectivity titre was also studied in order to follow the changes in the degree of virus adsorption, virus material harvested on the day of the experiment was used.

Titration of the virus. The method employed for determining HA titres has been described [9]. The fluid dripping off the hepatic vein was titrated for haemagglutination, both undiluted and in a serial dilution beginning 1 : 2. The original samples and their dilutions were mixed with an equal volume (0,1 ml) of a chicken erythrocyte suspension. Agglutination was read after 45 minutes. If no agglutination could be detected in the first tube, the titre was taken as «< 2».

Infectivity was titrated according to *Horváth* [10], in semi-micro tissue cultures made of chorio-allantoic membrane suspensions. As to the details of the procedure, the paper by

Horváth should be consulted. Five parallel semi-micro cultures were made of each virus dilution and after 72 hours' propagation the rate of multiplication was estimated by the haemagglutination method. The method allowed to estimate the infectivity titre within a margin of error of $\pm$ 0,3 log units.

Removal and perfusion of liver. With due regard to the experience of *Jancsó* [11], the following technique was employed in making the liver preparation. Young guinea pigs (250 to 300 g), adult rats (280 to 350 g), as well as old albino mice (25 to 30 g) were used. The animals were laparatomized under ether anaesthesia, the portal vein was gently compressed and through an incision made in its wall a glass cannula of suitable size, filled with saline, was introduced in the direction of the liver and held in place by ligation. Without delay the liver was perfused with saline to remove blood. Then the thorax was entered through the diaphragm, the inferior vena cava severed above the diaphragm and the animal was bled to death. The diaphragm was detached from the thoracal wall, the liver gently raised, the peritoneal parts and ligaments were cut and the liver so freed was removed from the abdomen. Meanwhile, saline with physiological perfusion was continued. The liver was placed on an inclined glass plate, 9×12 cm in size, with one corner as the lowest point. The fluid oozing out of the liver flowed toward this point, where it dripped off. The rate of flow could satisfactorily be estimated by counting the drops. The glass cannula inserted into the liver was attached to a glass coil in a water bath by means of a thin rubber tube. The temperature of the fluid passing through the coil could thus be regulated. The coil, whose internal diameter was 4 mm, ended in a small glass container, which formed the highest part of the system. The fluid poured into the container, after passing through the coolable coil and the liver, left through the hepatic vein, collected in small drops on the glass plate and dripped into a volumetric cylinder. The fluid collected in the cylinder was at intervals re-introduced into the glass container, in order to maintain a constant flow of the virus-bearing fluid. The total capacity of the coil and the cannula was 21 ml. For mouse livers the volume of the system was adequately reduced by means of shortening the tubing. The liver of guinea pigs and rats used in the experiment took up an average of 5 ml of fluid, while mouse liver could take up about 2 ml. These values were duly considered and were added to the volume of the tubing.

Prior to circulating the virus-bearing fluid, the coil was kept in melting ice and the liver was perfused with ice-cold dilute formaldehyde and saline for 30 minutes. As a result, the liver was considerably chilled and the thermometer inserted between its lobes showed temperatures of 8° to 9° C.

When the level of the last portion of the washing fluid reached the outlet of the glass container, the virus-bearing fluid was immediately poured into the container. In this way errors due to dilution of virus could be practically eliminated. Cooling was maintained while circulating the virus. Immediately after the virus was measured into the container we began to measure the volume of the fluid dripping out of the liver until 26 ml (or, with mouse livers, a proportionate volume) had collected, which was then discarded. After that moment the fluid dripping out of the liver was considered to be the virus material. The first 4 ml of this fluid collected in the volumetric cylinder was set aside as sample 1. This sampling marked the beginning of the experimental period. The collected portions, in the order of collection, were successively re-introduced into the container at the very moment it became empty. Precautions were taken to prevent bubbles of air from entering the system. By this simple method a steady flow of virus material could be maintained in the system. The livers of guinea pigs and rats were perfused with 40 ml, the mouse livers with about 20 ml of virus-containing fluid. It took about 10 minutes for the 40 ml of fluid to pass through the liver.

Control of liver preparations. According to *Jancsó* [11], the liver perfused with metal colloid sols filters out metal particles from the fluid. This is, however, not to be ascribed to Kupffer cell function, but is the result of the so-called »ultrafiltrative action« of the liver. In the presence of hydrophil colloids (serum protein, gelatin) the activity of Kupffer cells is markedly increased while in the absence of proteins the adsorbing capacity of the hepatic capillaries becomes very significant.

When a carefully washed liver preparation was perfused with India ink diluted with saline, the fluid dripping out of the hepatic vein was practically colourless. Microscopic examination of the liver revealed that the capillaries were obstructed by a very large number of India ink granules, but there were no such granules detectable in the Kupffer cells. If a mixture of India ink and bovine serum was used for perfusion, the outflowing fluid did not differ in colour from the original. In such cases histological examination showed no precipitated granules of India ink, but such granules were stored in the Kupffer cells.

Liver preparations treated with formaldehyde bound the introduced virus gradually, while untreated livers bound all the virus contained in the perfusion fluid on the first occasion already. These phenomena seem to indicate that on treatment with formaldehyde the non-specific adsorbing capacity of hepatic capillaries becomes either abolished or very greatly reduced.

For this reason the livers used were perfused with formaldehyde and washed thoroughly. Adsorption of virus was considered characteristic only if on rewarming the organ at a later point of time the virus could partly be eluted.

On completion of the experiment, the liver was perfused with 5 ml of dilute methylene blue in physiological saline, in order to determine whether all the lobes participated in the perfusion, indicating that the cannula was introduced properly.

Results

The liver preparations made as described above were perfused with influenza PR8, Lee, Swine, as well as with Newcastle virus. The experiments were carried out as follows.

The liver was perfused with chilled physiological saline and completely freed from blood. Then it was perfused with 100 ml cold physiological saline containing 0,5 per cent formaldehyde which was then removed by washing with cold saline for 20 to 25 minutes. In the liver so treated allantoic fluid diluted with saline at a ratio of 1 to 4 was circulated. Circulation of the allantoic fluid was continued for 60 minutes with samples taken at the beginning of the experiment, and then in intervals of 15 minutes. The samples were tested for haemagglutination. The allantoic fluid was then allowed to flow out of the liver, which was then perfused with 40 ml of chilled physiological saline for 30 minutes. Samples for HA testing were taken at 15 and 30 minutes.

After this, the rubber tube connecting the cannula to the coil was clamped, the liver and the cannula inserted into it were detached from the system and, covered with a piece of gauze soaked in physiological saline, they were placed for 30 minutes into an incubator of 37°C. At the end of this period the liver was perfused with 2 ml of body-warm physiological saline injected into the rubber tube on the cannula by means of a syringe equipped with a fine needle. The fluid dripping out of the liver was tested for haemagglutination. The entire procedure was then repeated and sampling after half an hour obtained. All this was made in order to find out whether the virus bound by the chilled liver would be released at body temperature. The results are summarized in Table I.

As shown in Table I, the 9 experiments performed with various viruses on the livers of guinea pigs, rats and mice, respectively, yielded unequivocal results. The virus became gradually bound in the formaldehyde-treated, washed and chilled livers and by the end of this stage of the experiment HA tests failed to demonstrate the presence of virus. The chilled liver retains all, or at least most, of the virus bound, as was shown by the fact that subsequent perfusion with chilled water yielded a washing fluid which contained no such amounts of virus as are detectable by haemagglutination. Illustrative of the partly reversible nature of virus adsorption is the HA titre of samples taken after the liver had been warmed up. Such samples yielded varying agglutination titres in the individual experiments.

TABLE I

Summary of Liver Perfusion Experiments in Different Animals

Species of exp. animal and titre of virus used	Stage of experiment	Time of sampling (min)*	HA titre of sample**			
			PR8	Lee	Swine	NDV
Rat						
PR8 160		0	16	48	48	128
		15	8	24	48	64
Lee 160	Perfusion with virus	30	< 2	16	8	32
Swine 160		45	< 2	2	2	32
NDV 160		60	—	—	< 2	16
	Perfusion with saline	15	< 2	< 2	< 2	< 2
		30	< 2	< 2	< 2	< 2
	Elution in incubator	30	12	24	8	8
		60	12	32	8	8
Guinea pig						
PR8 256		0	16	16		48
		15	8	8		24
Lee 128	Perfusion with virus	30	8	4		24
Swine 192		45	4	< 2		12
		60	—	—		4
	Perfusion with saline	15	< 2	< 2		< 2
		30	< 2	< 2		< 2
	Elution in incubator	30	128	128		16
		60	48	128		16
Mouse						
PR8 96		0	24			32
		15	12			16
NDV 128	Perfusion with virus	30	12			16
		45	4			8
		60	2			8
	Perfusion with saline	15	< 2			< 2
		30	< 2			< 2
	Elution in incubator	30	12			32
		60	8			32

* = 0 minute means the first 4 ml sampling.
** = The values are the reciprocals of HA titres.
— = Not tested.

The evidence obtained in the experiments has clearly shown that virus was adsorbed onto, and eluted from, the vascular endothelium. The HA test demonstrates high concentrations of virus only and in order to elucidate the finer details of this interaction between virus and vascular endothelium, the more sensitive infectivity titration method must be resorted to. Since this latter method is capable of demonstrating quite small amounts of virus, the procedure had to be slightly modified. Two representative experiments of this type are described in the following.

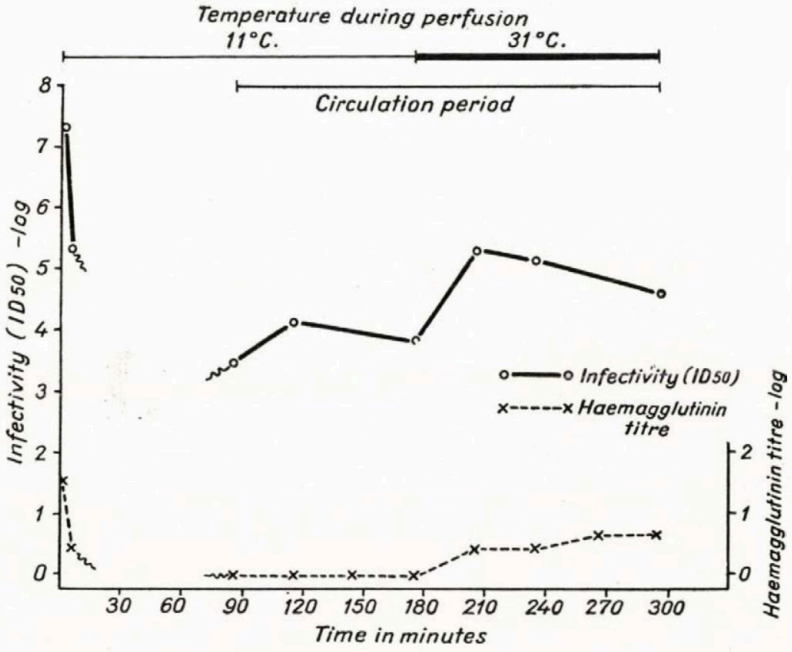


Fig. 1. The adsorption and the elution of PR8 virus in the hepatic vessels of rat

A rat liver, prepared as described above, was perfused with physiological saline at room temperature for 60 minutes and then for 10 minutes with saline containing 0,62 per cent formaldehyde. Then chilled physiological saline was circulated in the hepatic vessels for 60 minutes with the double purpose of removing the formaldehyde and to chill the liver. Subsequently, as described, 40 ml of the PR8 allantoic fluid virus diluted at a ratio of 1 to 5 was perfused under pressure. The last 2 to 3 ml of the virus material dripping out after passing through the liver were pooled separately to be used later for titration of virus. After this, 300 ml of chilled saline were passed through the liver preparation and the washing fluid was discarded. This procedure took 80 minutes. After the hepatic vessels were thoroughly washed, 40 ml of chilled saline were circulated in the system by the described method. The temperature

of the outflowing saline was 11°C. From the beginning of the actual experiment (i. e. when perfusion with the virus-bearing fluid had been started) until the 175th minute the circulating fluid was chilled. In this period, between the 85th and 175th minutes, three samples were taken for titration of virus. Then the glass coil was taken out of the melting ice and placed into a 37°C water bath. The circulating fluid was kept warm until the 295th minute, when the experiment ended. In this period when the temperature of the fluid dripping out of the liver was 31°C, a number of samples were again taken from the perfusion fluid.

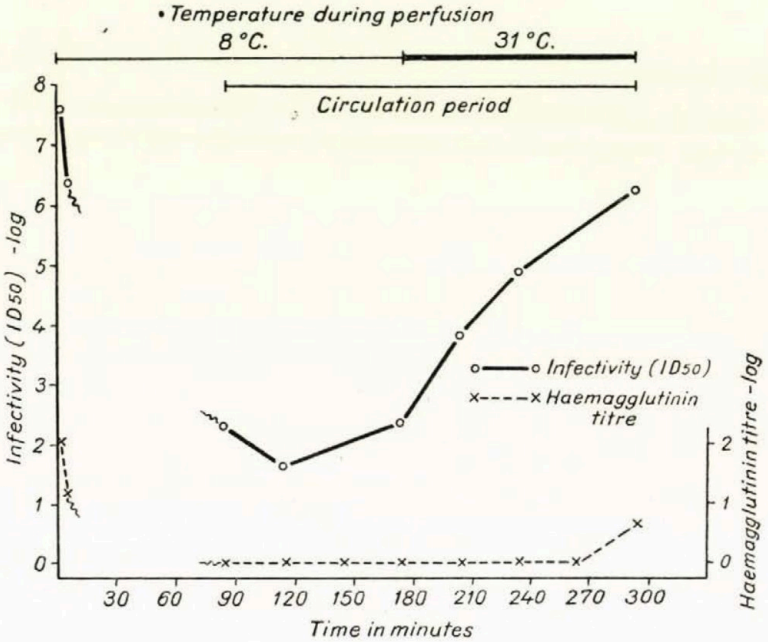


Fig. 2. The adsorption and elution of PR8 virus in the hepatic vessel of guinea-pig

The results of the experiment carried out with the rat liver preparation are shown in Fig. 1.

It is seen that, both the infective and HA titres of the virus material that had passed through the liver were significantly reduced.

The sample taken 90 minutes after washing, when the circulation of the allantoic fluid virus had just begun, contained virus in a titre of only $10^{-3,5}$ as compared to the initial titre of $10^{-7,33}$. During perfusion with cold fluid, the titre rose slightly, then became insignificantly reduced again. The difference between the two values was just within the limits of error of the procedure. On warming up the circulating fluid, considerable amounts of virus were liberated, as shown by the rise in both the infectivity and the HA titres. The subse-

quent slow reduction in infectivity titre was most probably due to a thermal inactivation of the virus.

The experiment was reproduced under identical conditions with guinea pig liver (Fig. 2), using the same PR8 virus (40 ml of allantoic fluid, diluted at a ratio of 1 : 5). It can clearly be seen in Fig. 2 how the virus was adsorbed even during perfusion with cold fluid and how it was gradually released, particularly on warming up. At the end of the experiment even the HA method revealed the presence of virus.

Discussion

Liver preparations, from which the blood had been removed, were perfused with dilute formaldehyde through a cannula inserted into the portal vein and then thoroughly washed. After such treatment the livers bound influenza and ND viruses gradually. In support of the firm attachment of virus is the fact that elution with cold saline failed to remove it from the liver. The disappearance of virus on perfusion with cold fluid is due to the adsorptive action of the hepatic vascular endothelium. The mechanism involved is similar to that observable with adsorption onto erythrocyte or onto pulmonary epithelium, where the virus can also be released from the surface by increasing the temperature prevailing in the system.

Thus, according to the above observations, the internal surface of blood vessels is capable of adsorbing virus in a characteristic manner. The elution resulting from an increase in temperature is thought to be due to the activity of an assumed receptor-destroying enzyme of the virus. On the basis of the experiments it could, however, not be decided whether the virus-receptor substance is localized on the surface or in the connective substance of the vascular endothelium. The existence of such an inter-endothelial substance has been generally accepted, the more so, as it can be demonstrated by adequate histological methods (silver impregnation).

Whether the endothelial cells themselves, or the intercellular connective substance, are the subjects of the receptor-destroying enzyme presumably possessed by the virus, it may rightfully be asked whether this would be of consequence on the permeability of vessels and, *ceteris paribus*, is this action not one of the factors responsible for the well-known toxic character of influenza virus. The rat, rabbit and guinea pig, which are otherwise not susceptible to influenza virus, develop extensive lesions, or even die, on inoculation with large amounts of virus. There are sometimes quite striking circulatory manifestations. For instance, influenza virus injected into the anterior chamber of the rabbit's eye will cause corneal opacity and moderate iritis. The influenza virus inoculated into the rat brings about a considerable fall of blood pressure

(*Chang* and *Kempf*, 12). Even in human pathology the cardio-vascular effects of influenza virus are known phenomena [13, 14].

With respect to this problem, the observations made by *Henle* and *Henle* [15] are particularly significant. They inoculated large amounts of influenza virus, intravenously or intraperitoneally, into mice and at autopsy found in the liver focal necrosis, and in the spleen hyperaemia, degeneration of Malpighian bodies and in some cases petechiae. The latter were not infrequent in the stomach either. In addition, considerable pleural effusion could also be detected.

It seems justified to assume that one of the factors involved in the development of the above s mptoms is an alteration of vascular permeability, arisen perhaps in consequence of an enzymic action of the influenza virus. The assumption is rather tempting and would be even more so, had it not been reported by *French* and *Ada* [16] that very large doses (50 000 U per guinea pig) of highly purified receptor destroying enzyme isolated from cholera vibrio cultures were not toxic. The complicated structure of the influenza virus may by no means be considered identical with the enzyme of the cholera vibrio. Consequently, the above observation by itself does not suffice to discredit the assumption that the influenza virus has a direct injurious effect on vascular endothelium.

SUMMARY

The portal vein was cannulated in the guinea pig, rat or mouse and the liver perfused with saline and thus rendered free of blood. The organ preparation so obtained was perfused with dilute formaldehyde, which was then carefully washed off. Subsequently, allantoic fluid containing PR8, Lee, Swine, or ND virus was circulated in the vessels of the liver preparation. During this perfusion with cold fluid large quantities of virus were gradually adsorbed. On increasing the temperature of the system by heating to above 30°C or by circulating body-warm physiological saline in the hepatic vessels, part of the bound virus became gradually released. Thus, in the animal species mentioned the viruses examined were adsorbed onto, and eluted from, the internal surface of the vascular endothelium in a manner characteristic for the influenza and related viruses. On this basis it may be assumed that the surface of the vascular endothelium coating the lumen of vessels contains a virus-binding receptor substance. It is suggested that a direct action on vascular endothelium may be one of the factors responsible for the toxicity of influenza virus.

LITERATURE

1. *Burnet, F. M.:* Physiol. Rev. **31,** 131 (1951).
2. *Burnet, F. M.:* Roy. Melbourne Hosp. Clin. Rep. Cent. Vol. (1948).
3. *Burnet, F. M.:* Proc. Roy. Soc. B., **138,** 47 (1951).
4. *Anderson, S. G.:* Austr. J. Sci. **12,** 147 (1950).
5. *Bieling, R.* and *Oelrichs, L.:* Ztschr. Hyg. **127,** 545 (1948).
6. *de Burgh,* cit. *Burnet* (1).
7. *Hirst, G. K.:* J. Exp. Med. **78,** 99 (1943).
8. *Fazekas* de *St. Groth, S.:* Austr. J. Exp. Biol. Med. **28,** 15 (1950).
9. *Szőllősy, E., Ivánovics, G.* and *Horváth, St.:* Acta Physiol. Hungarica, **3,** 431 (1952).
10. *Horváth, St.:* Acta Microbiol. Hungarica. **1,** 481, (1954)
11. *Jancsó, N., Jun.:* Ztschr. ges. exp. Medizin **64,** 256 (1929).
12. *Hsioh-Teh Chang* and *Kempf, J. E.:* J. Immunol. **65,** 75 (1950).
13. *Koblika, F.:* Lekarsky Listy **1,** 32 (1946).

14. *Finland, M., Parker, J., Barnes, M. W.* and *Jolliffe, L. S.:* Am. J. Med. Sci. **209,** 455 (1945).
15. *Henle, W.* and *Henle, G.:* J. Exp. Med. **84,** 623 and 639 (1950).
16. *French, E. L.* and *Ada, G. L.:* Nature **165,** 849 (1950).

СПОСОБНОСТЬ ЭНДОТЕЛИЯ МЛЕКОПИТАЮЩИХ ЖИВОТНЫХ К СВЯЗЫВАНИЮ ВИРУСА ГРИППА

Г. Иванович, И. Хорват и *Э. Сёллёши*

Р е з ю м е

Авторы производили обескровливание печени морских свинок, крыс или мышей путем перфузии соленой водой через стеклянную канюль, введенную в воротную вену. Через кровеносные сосуды полученного таким образом препарата пропускали жидкий раствор формалина, затем тщательно вымывали их от формальдегида. После этого в кровеносных сосудах препарата печени вводили в циркуляцию аллантоисную жидкость, содержащую вирусу PR8, Lee, Swine или ND.

В процессе этой холодной перфузии наличие вируса в жидкости постепенно и в большом количестве сокращалось. Если препарат печени подогревали более, чем до 30°, или через кровеносные сосуды пропускали соленую воду температуры тела, часть связанного вируса постепенно освобождалась. Таким образом, на эндотелии кровеносных сосудов упомянутых животных исследуемые вирусы адсорбируются и элюируются характерным для гриппа и родственных ему вирусов образом. На основе вышеуказанного можно предполагать, что поверхность эндотелия, выстилающего просвет кровеносных сосудов, содержит связывающие вирус рецепторы. В результате наблюдений авторы считают возможным, что один из факторов токсичности вируса гриппа должен разыскиваться может быть именно в оказываемом им непосредственно на кровеносные сосуды действии.

EPIDEMIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE 1953 INFLUENZA EPIDEMIC IN HUNGARY

By

A. PETRILLA

State Institute for Public Health, Budapest

(Received February 18, 1954)

Opinions differ as to the arisal and spread of influenza epidemics. Some authors claim that such epidemics would start from a well-defined geographic area, from some country, and would spread from there to other areas or countries. Others favour the view that the virus is present everywhere, can go »underground« and that epidemics break out simultaneously in various areas. More recently, *Andrewes* [1] has published a survey of the current views and stated that while epidemics caused by *A* virus usually originate from a circumscribed area, those due to influenza *B* virus are more often local in nature.

It has been stated in the WHO report [2], as well as by *Andrewes* [1], that while in 1948—49 influenza probably started from Sardinia and the first observations made in 1950—51 strongly suggested a Scandinavian origin, the epidemics occurring in the winter 1952—53 were multicentric and broke out simultaneously in different areas. In December there were nearly simultaneous outbreaks in Japan and in the United States, followed by outbreaks early in January, first in France and England, then in West-Germany, Switzerland, Finland, Yugoslavia, Italy, and Portugal. In most countries *A*-prime strains were recovered, except in Denmark and Sweden. In the former country a considerable number of *B* strains could be isolated along with the *A*-prime strains, while in Sweden only *B* strains were recovered at the beginning, *A*-prime strains being detectable only later.

In the following — along with a survey of data relative to previous years and some methodical remarks — we wish to describe the details of the 1953 influenza epidemic in Hungary. This could be clearly followed in its spread from north to south across the country and was, as shown by the strains isolated, due to influenza *B* virus. The epidemic was, accordingly, somewhat different from what has been described in the WHO report [2] and by *Andrewes* [1] about European epidemics and confirms the view that even *B*-type epidemics may show a tendency to spread.

To measure the extent and follow the spread of an influenza epidemic is not easy. The difficulties involved have recently been pointed out in our report on the 1950—51 epidemic [3], and in this connection we refer to a paper by

Deutschman [4] in which the same conclusions have been drawn from an analysis of international data.

There are a number of outstanding features in an influenza epidemic, the simultaneous observation of which enables us to gain information relative to its extent and seriousness.

One of such factors is the *mortality* rate. This seems to be the most suitable basis for comparing international data, although with many inherent difficulties.

Another indicator that must not be left out of consideration is the outcome of *general mortality*. During an influenza epidemic some of the deaths are ascribed to other diseases or complications, such as pneumonia, bronchopneumonia, etc. In a comparative survey of international data it is therefore advisable to study the data of general mortality. The same is valid for observations concerned with long periods of time in a particular country.

Both influenza mortality and general mortality are data which become available for an extensive area only after a certain time has elapsed and are consequently no immediate indicators of the spread and extent of the epidemic

It is obvious that for a close follow-up of an influenza epidemic such indicators should be used which show from day to day the number of fresh cases and make thereby new outbreaks detectable. A variety of data are suited for this purpose.

Cases of influenza are reported in a different way in different countries. In Hungary, only complicated cases must be reported. This system, although it reveals to some extent the severity of the outbreak, does not permit a recording of cases with a mild course. Reporting of complicated influenza has been compulsory in this country since 1931 and the data accumulated since that time may serve the purpose of evaluation. A shortcoming of this procedure is that cases are reported usually with a few days' delay and that complications do not always develop right at the beginning of the outbreak.

A more rapid indicator is a survey of *morbidity data for groups of people living at close quarters*, such as colleges, barracks, schools. Morbidity data relative to such groups, or the number of absentees may be quite relevant. Other data that might be considered are numerical reports on influenza cases by general practitioners, sales at chemists', number of admission to hospitals, etc.

For the past few years we have been studying practically all of the above data during influenza epidemics. In large towns of this country reporting the cases of influenza by general practitioners has been made compulsory. The number of those absent from work in large factories and offices were observed. The number of children absent from school were recorded. Sales at chemists' shops were followed from day to day. The number of patients admitted to hospitals with influenza were recorded. In addition, of course, the number of the complicated cases and deaths reported were also recorded.

Of the above procedures, observation of the number of children absent from schools proved to be the most rapid and the most reliable method. Consequently, it has been made compulsory for the more populated schools, where children 6 to 14 years old aggregate in major groups, to report daily by telephone the total number of children absent. This procedure has been found to be the most adequate for observing the onset, extent and other characteristics of an epidemic. The results are, to some extent, influenced by the fact that the number of children absent includes the number of those absent for reasons other than influenza. Experience has shown that in epidemic-free periods 5 to 8 per cent of the children

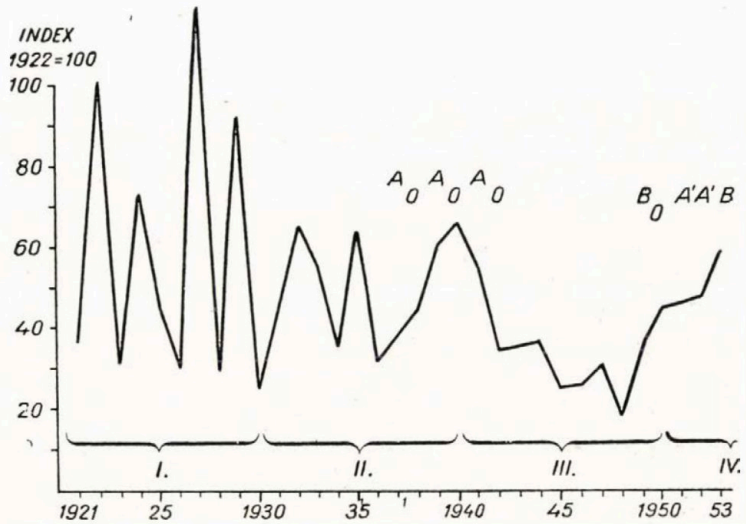


Fig. 1. Influenza mortality in Hungary. A = *A* virus isolation positive, B = *B* virus isolation positive, 0 = Virus isolation failed

are usually absent ; since this percentage may be easily followed from day to day, during an epidemic the increase in the number of absent children will permit conclusions as to the extent of the epidemic. The epidemic curve plotted from the number of absent children is naturally influenced by the fact that i includes not only fresh cases, but also the whole course of the disease. Nevertheless, this method has proved the most satisfactory, which naturally does not mean that the other data mentioned are considered negligible. In the following, a variety of factors will be evaluated in order to present as estimate of the extent and severity of epidemics.

In Fig. 1 are shown the mortality data. From this it can be stated that following the serious pandemic of 1918—19, for some time, to be more exact, until 1930, the epidemics broke out in every other year, except for one case. In this stage (I) mortality rose high in each epidemic year, i. e. it clearly indicated the influenza epidemics.

The next part of the mortality curve (II) shows the period from 1930 to 1941. In this stage the mortality periods are not regular, the index numbers are lower than in the previous epidemic years, the morbidity data (Fig. 2) are not always parallel with mortality, nor, as it will be seen below, with data relative to the isolation of virus. As compared to the former period, decline seems to have occurred in the mortality rate.

In period III (from 1942 until 1949) mortality data do not indicate influenza epidemics, and the same follows from the morbidity data (Fig. 2).

In 1950 a new stage began in influenza mortality (IV). The index number began to increase, but did not reach the levels of stage II, and lagged far behind the high mortality rates of the years of stage I. For this latter stage we have by now also other, more detailed data at our disposal.

n Fig. 1 we have shown the years in which the Department of Virus Research of the State Institute for Public Health has isolated strains of influenza virus and the types they belonged to. In 1937,1939 and in 1941 the strains recovered were of the *A* type, while in the years between all attempts at isolating virus have failed. Between 1943 and 1948 virus research was discontinued, to be resumed again in 1949. In that year most of the strains were of the *B* type, in 1951 and 1952 *A*-prime, in 1953 *B* type, with no strains recoverable in 1950 [5, 6, 7 and 8]. It can be seen in the Figure that the changes in mortality rate did not run parallel with the results of virus isolation. A considerable number of influenza virus strains could be isolated in years when the mortality rates did not indicate an epidemic (e. g. 1937, 1949), and, vice versa, attempts at isolating virus failed in years when mortality was high (e. g. 1940, 1950). *Thus, mortality by itself is not a sufficient indicator of influenza epidemics*, it may only show the severity of the outbreak. For observing mild epidemics, other methods must be resorted to.

Morbidity data are shown in Fig. 2. (As already mentioned, only complicated cases of influenza are compulsorily reported in Hungary.) The Figure shows the very period, in which mortality data were not characteristic (Fig. 1). The number of complicated cases reported may be considered as an indicator and if it is taken as such, the Figure clearly shows the alternation of epidemic and non-epidemic years. The results of virus isolation are also shown in this figure and it may be seen that in this respect the situation was the same as described above. It is striking that in 1938 and in 1940 no virus could be isolated, although mild influenza occurred in both years. At that time, however, research on nfluenza *B* viruses was not yet efficient and it is not impossible that in those years the epidemics were due to influenza *B* virus.

As it can be seen, the epidemic of 1949 was only a mild one, as it was confirmed by data to be presented later. In 1951 *A*-prime strains were recovered, even from cases occurring in Budapest. As it will be disclosed below, in that year only in some country towns could we detect a few minor local outbreaks.

The number of reported cases was unusually high in 1953, when *B* type virus could be isolated. This is partly attributed to the fact that the practitioners were repeatedly asked to report their cases and consequently the number of such reports increased. It is, however, also true that for many years this has

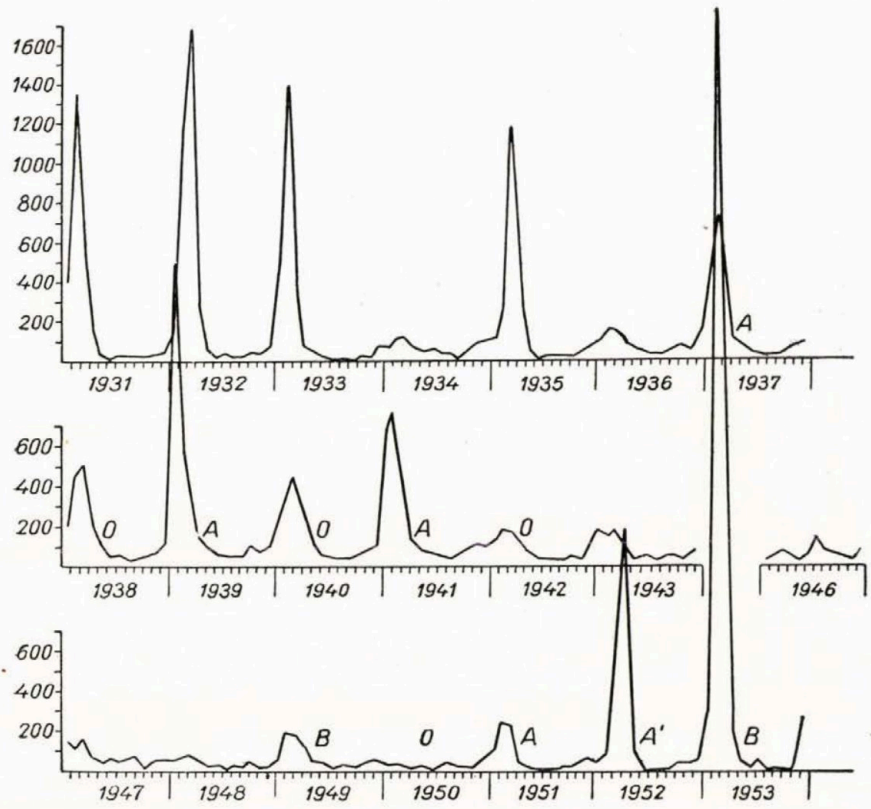


Fig. 2. Reported cases of complicated influenza in Hungary

been the most wide-spread epidemic, as it was apparent from the number of hospitalized cases and other data.

By the end of 1953 the epidemic curve was steeply rising again, in indication of the outbreak that was to come early in 1954.

As to the seasonality of epidemics, the weekly records of the reported complicated cases supply some information (Fig. 3). From these we may derive the conclusion that during the 22-year period under discussion there has not been a single influenza epidemic in Hungary that would have begun earlier than January and that would have not ended by about the end of March. The only exception was the 1952 epidemic, which began to rise relatively late, in the middle of March. As already pointed out, in that year each of the recovered

strains was of the *A*-prime type. It is shown also by this figure that between 1942 and 1951 no serious epidemics occurred in this country, as already mentioned in connection with the mortality rates.

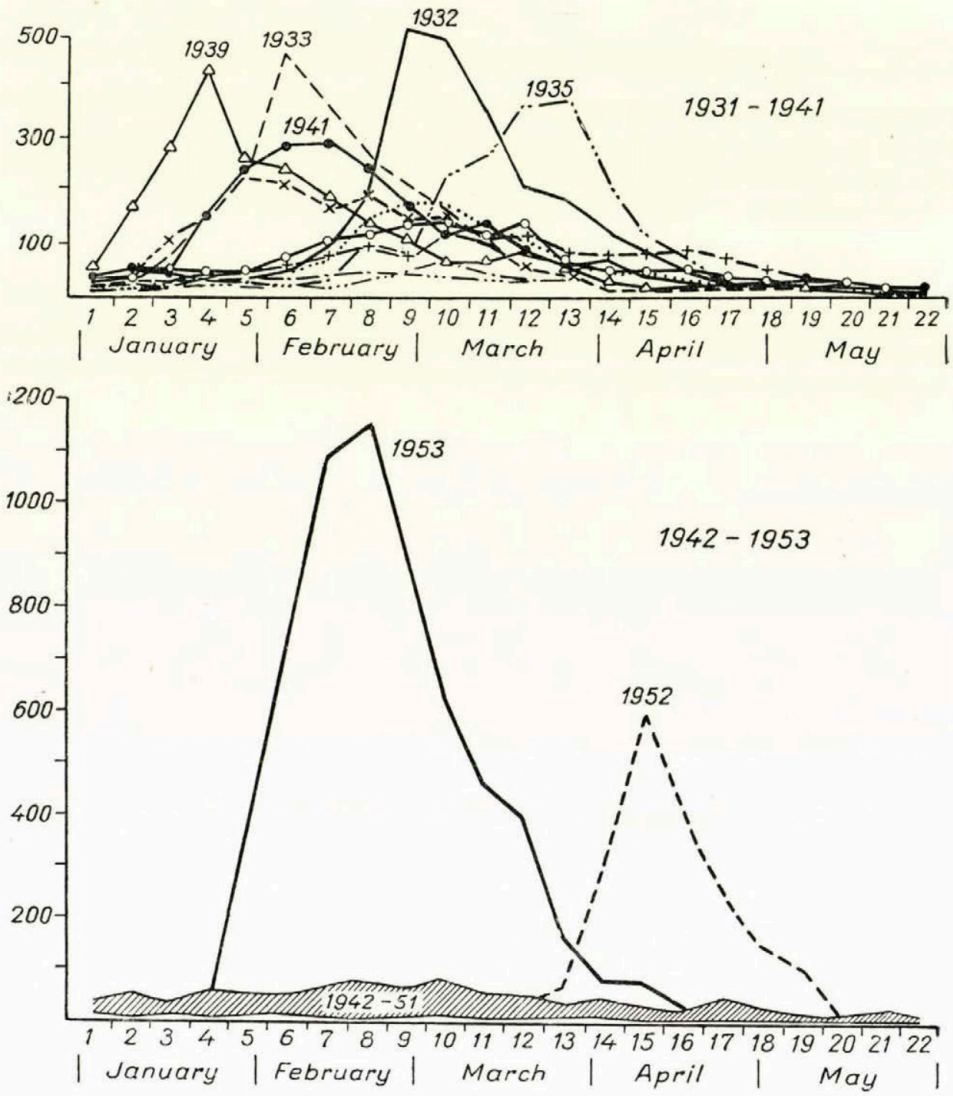


Fig. 3. Reported cases of complicated influenza in Hungary by weeks

The data on mortality and morbidity are for the whole country and are consequently inadequate to be used for analyzing precise epidemiological details of influenza. During mild epidemics the incidence of lethal or complicated cases in small areas is so low that no far-reaching conclusions may be derived from it.

This is the reason why we have chosen the observation of the index numbers of children absent from schools as a means permitting a detailed analysis. This kind of computation will be reliable only if sufficiently large numbers are involved to render negligible the error caused by absenteeism due to other causes.

Data relative to children absent from Budapest schools (Fig. 4) reveal that in 1949 a mild epidemic of protracted course took place in the capital. At the same time, as it can be seen in the previous figures, the mortality rates did not

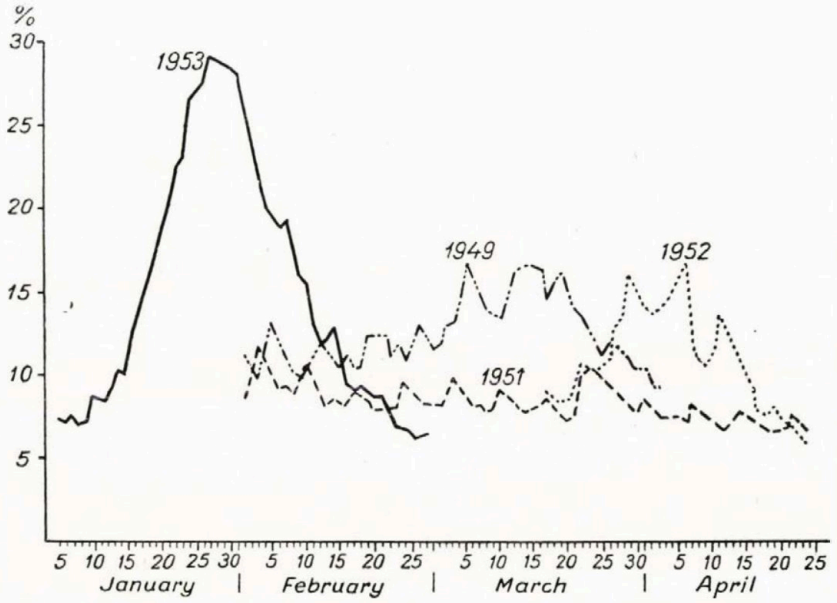


Fig. 4. Percentage of children absent from Budapest schools

indicate the presence of an epidemic and even the complicated cases reported from the total area of the country suggested a mild epidemic only. As early as February, 10 to 12 per cent of the children were absent from schools and this percentage did not rise higher than 17 per cent even at the peak of the epidemic. From these Budapest cases *Farkas and Takátsy* [6] recovered *B*-type strains of influenza virus. From other areas of the country influenza epidemics were not reported. In spite of this, the above authors succeeded in isolating an *A*-prime strain from a local outbreak in a small village.

In our report on the influenza epidemic of 1951 [3] it was pointed out that in 1951, when in Liverpool serious forms were already being encountered and when in Western Europe, too, influenza epidemics due to *A*-prime virus were occurring in various areas, in this country only a few isolated outbreaks affecting a limited number of small villages could be detected. From the latter

outbreaks *A*-prime and *B* virus could be recovered [7]. Budapest, the capital of Hungary, was free of epidemic in 1951 (Fig. 4), and the data for absence from schools or from factories comply with this observation.

In 1952, however, the situation was different. As it is shown in the previous figures, mortality data did not show anything characteristic (Fig. 1), and morbi-

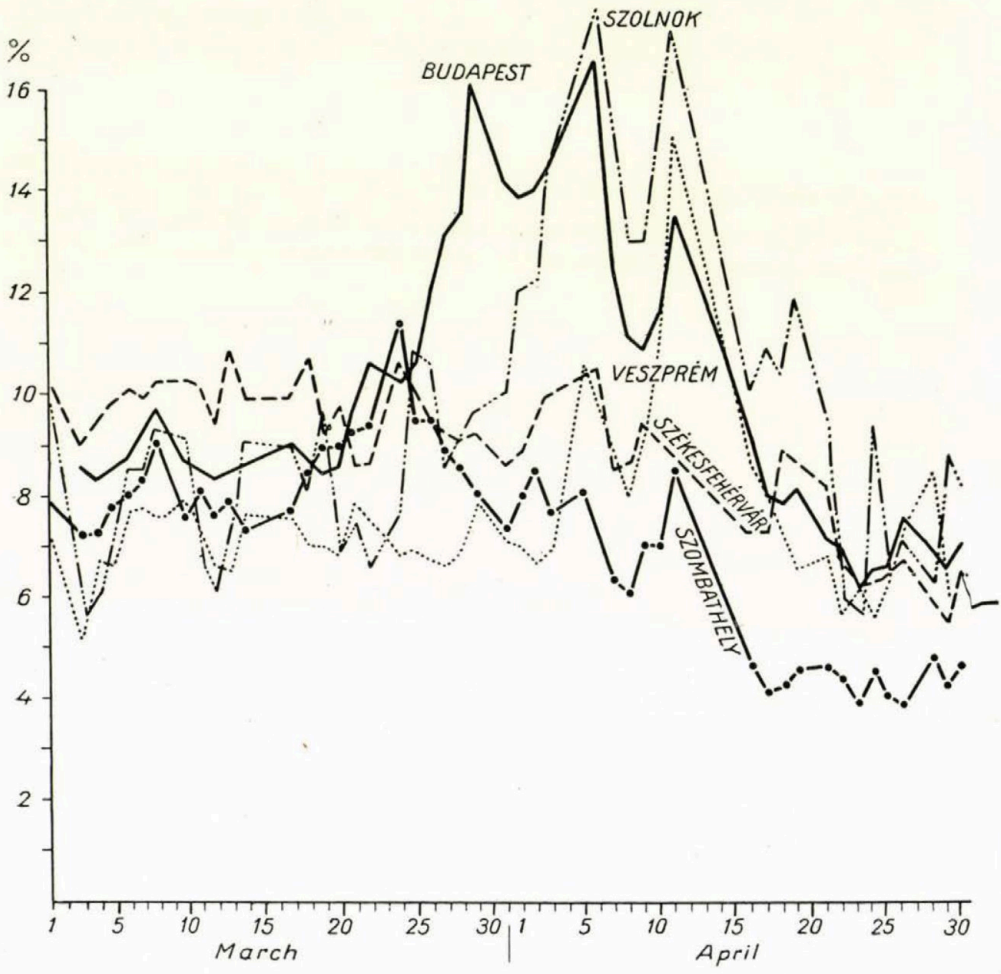


Fig. 5. Absence from schools in 1952

dity data for the whole country indicative of a mild epidemic only (Figs 2 and 3). In 1952 the epidemic broke out rather late and was most extensive in Budapest. Its mildness is clearly illustrated by the relatively small number of children absent from schools (Fig. 4). Apart from the epidemic in Budapest, only a few country towns experienced mild epidemics in that year. The data relative

to some of these towns are shown in Fig. 5, where it can be seen that among the larger country towns only in Szolnok was there an epidemic similar to that of Budapest, while in the rest of the towns (of which but a few are included in the figure) the percentages of absent schoolchildren did not indicate the occurrence of an influenza epidemic. This, quite plausibly, may be explained by the onset of warm spring weather, which might very well have prevented further spread. In the light of what we have stated above concerning previous years, an immunological explanation would not be so acceptable.

Thus, it may be concluded that *while in the period between 1942 and 1948 practically no influenza epidemics occurred in Hungary, between 1949 and 1952 there were local outbreaks, partly in Budapest and partly in some areas of the country.* An analysis of the mortality data for the whole country is inadequate for revealing precise epidemiological details.

Information relative to *the spread of the 1953* epidemic is given in Fig. 6, in which the percentage of children absent from schools is shown for each town. The first cases occurred in Esztergom and Komárom (designated 1 and 2 in the Figure), i. e. in those two towns which, beside the Danube, are next to the Czechoslovakian border. No detailed information was received from Czechoslovakia, but we know that there an influenza epidemic broke out in December 1952, and in the towns and villages near to our country a great number of cases were reported by the end of December already. To our knowledge, the strains recovered in that country were of the *B*-type. It is most likely that the virus was carried over from there into the two border towns, where the epidemic spread rapidly and such a high proportion of schoolchildren were affected that the schools had to be closed. By the middle of January the epidemic broke out in Budapest. (Town No. 3 on Figure 6.) Here, as it can be seen in Figures 2, 3 and 4, the epidemic was much more extensive than usually. There are quite close connections between Budapest and the two towns mentioned and this may explain the relative rapidity of spread. From Budapest, the epidemic spread to other towns which are in close contact with the capital, and, as shown in Fig. 6, the data for children absent from schools clearly indicate the differences in the time of onset and extent. In most towns the spread was similar to that in Budapest. There were, however, towns, such as Veszprém (No. 10) or Miskolc (No. 9), where the epidemic took a prolonged course (Part II Fig. 6). It was unusual that in the second largest town of Hungary, Miskolc, the epidemic did not spread as rapidly as it did in other towns. In localities situated further to the south or east from the main lines of communication, as well as in smaller towns (Part III, Fig. 6, Curves 12, 13, 14, 15 and 16) the epidemic broke out considerably later, at the beginning of February, but its course was similar to that of the outbreaks observed in other towns and villages. The towns and villages shown in Fig. 6 were selected at random; to present all the data at our disposal would exceed the scope of this paper.

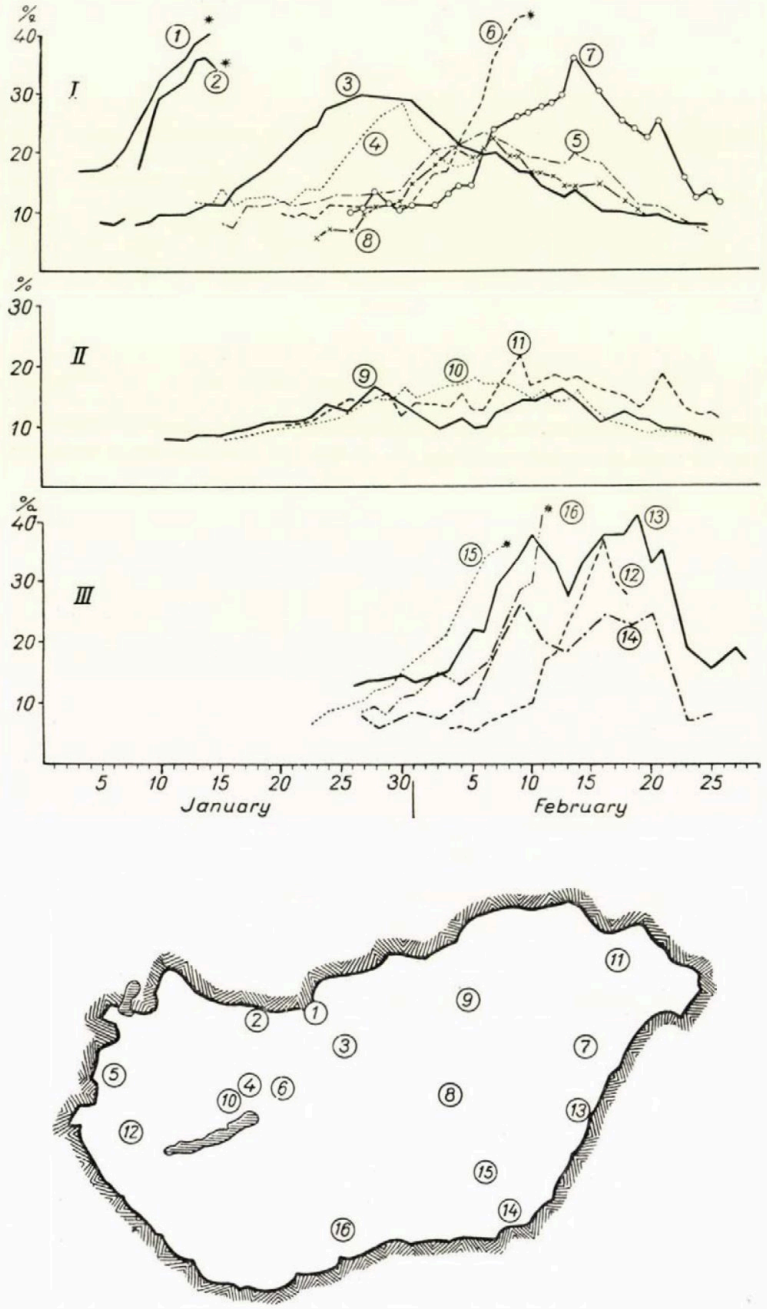


Fig. 6. Percentage of children absent from schools in 1953

* Schools were closed

Data relative to absent schoolchildren enable us to follow the spread of influenza epidemics even within the area of a town. During the 1953 epidemic in Budapest, District XIII reported the first outbreaks (Fig. 7), with District XXII as the last one. In most of the other districts the change in the percentage of absent children occurred more or less simultaneously. Illustrative of this is the example of District V (Fig. 7); the epidemic curves for other districts were greatly similar. As it has been shown in Fig. 1, the mortality rates did not indicate an extensive epidemic, while the number of complicated cases reported (Figs. 2, 3, 4) clearly displayed the actual general situation.

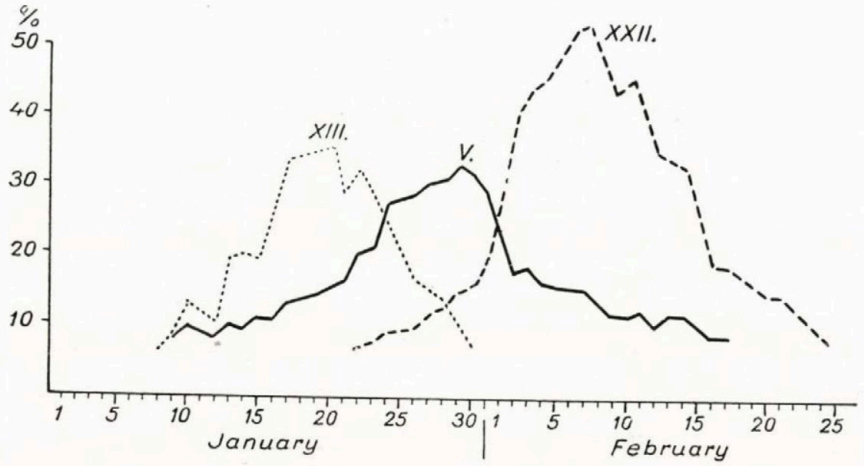


Fig. 7. Percentage of children absent from schools in some districts of Budapest

It may be stated that in general the 1953 influenza epidemic spread over to Hungary from the North and was further disseminated from Budapest. In towns and villages more closely connected with Budapest the epidemic broke out somewhat earlier than in distant localities or those less closely connected with the capital. The villages shown in Part III of Fig. 6 are situated at the southern and south-eastern border of the country and their example shows that the epidemic, after entering through the northern border, spread across the country, down to the southern borders. The course taken by the epidemic in Yugoslavia or in Rumania is not known in its details.

It has been mentioned that *Farkas and Dömök* [8] succeeded in isolating virus during the 1953 epidemic and that these were of the *B*-type in the majority of cases. It is known from both the WHO report and the review of *Andrewes* that the epidemic that took place in Sweden in the autumn of 1952 was caused by a *B*-type strain and it is quite probable that this strain has spread southwards and, after passing Czechoslovakia, has entered our country.

The 1953 epidemic was the one most serious during recent years.

The population of Budapest having experienced an influenza epidemic in 1952, it came as a surprise that another outbreak would occur so soon, after the lapse of 10 months only. This, however, may be explained by the fact that the 1952 epidemic was caused by an *A*-prime type virus, while the 1953 one by *B*-type virus.

For the sake of completeness it should be mentioned that at the middle of December, 1953, still another influenza epidemic broke out, which was similar in extent to the one described in this paper and which epidemic reached its peak in January, 1954. The strains recovered from that new epidemic were all *A*-prime in type. Without going into details, we must point out that at that time, according to the data available, no influenza epidemic occurred in other parte of Europe.

SUMMARY

The spread and extent of influenza epidemics may not be judged adequately on the basis of mortality data alone, as these do not indicate epidemics with a mild course. In Hungary, morbidity data include only complicated cases of influenza. In order to evaluate the precise details of an epidemic, along with other indicators the changes in the number of children absent from school were taken as a basis. In 1949, restricted to Budapest, there occurred an influenza epidemic of prolonged nature, due to a strain of the *B*-type. In 1951 the capital was free of influenza and only in some villages could we observe epidemics due to *A*-prime virus. On the other hand, in 1952 Budapest was mainly affected and this time the pathogenic agent responsible for the epidemic belonged to the *A*-prime type. In January and February, 1953, an extensive *B*-type epidemic spread across the country. This epidemic started in towns situated near the Czechoslovakian border, from where it spread first to Budapest and then to major towns. In about one month's time it reached the smaller towns lying near the Yugoslavian border. The general mortality was scarcely higher than in epidemic-free years, in spite of the fact that the epidemic was more widespread than those occurring during the two preceding years. In December, 1953. a new epidemic, similar in extent, broke out. This was caused by *A*-prime influenza virus.

LITERATURE

1. *Andrewes, C. H.:* Bull. World Health. Org. **8,** 595 (1953).
2. WHO. Epid. and Vital Stat. Rep. **6,** 203 (1953).
3. *Petrilla, A.:* Népegészségügy **32,** 444 (1951).
4. *Deutschmann, Z.:* Bull. World Health. Org. **8,** 633 (1953).
5. *Taylor, R. M., Petrilla, A., Dreguss, M.:* Jour. Inf. Dis. **68** , 90 (1941).
6. *Farkas, E., Takátsy, Gy.:* Népegészségügy **30,** 402 (1949).
7. *Dömök, I., Farkas, E., Gál, M.:* Népegészségügy **32,** 449 (1951).
8. *Farkas, E., Dömök, I.:* Acta Microbiol. Hung. **1,** 471 (1954).

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЭПИДЕМИИ ГРИППА 1953 ГОДА В ВЕНГРИИ

А. Петрилла

Резюме

Для наблюдения распространения и размеров эпидемий гриппа данные о смертности не являются вполне удовлетворительными, так как не отражают легко протекающиеэпидемии. Данные о заболеваемости в Венгрии касаются только осложненных случаев.

С целью проведения более точных наблюдений — наряду с прочими индикаторами — учитывалось также и движение числа пропускающих школу учеников. Продолжительная эпидемия 1949 года, вызванная гриппозным штаммом типа B, протекала только в столице. В 1951 году эпидемия миновала столицу и только в нескольких окрестных селах отмечались вспышки гриппа *A'*. В противоположность этому эпидемия 1952 года протекала преимущественно в столице, и причиной ее оказался штамм типа *A'*. В январе и феврале 1953 года эпидемия гриппа B охватила всю страну. Первые вспышки наблюдались на севере, в двух городах, лежащих на границе Чехословакии, оттуда эпидемия проникла в столицу, затем в более крупные города и приблизительно через месяц появилась в более мелких городах, расположенных вдоль южной границы. Число летальных исходов едва превышало смертность предыдущих, внеэпидемических лет, хотя по распространенности последняя была гораздо шире наблюдавшихся за период двух последних лет эпидемий. В декабре 1953 года вновь началась аналогичная по размеру эпидемия, вызванная штаммом *A'*.

EINE METHODE ZUR SAMMLUNG VON STERINOXYDIERENDEN MIKROORGANISMEN

Von
A. KRÁMLI, G. PULAY und J. LANTOS

Medizinisch-Chemischens Institut der Universität Szeged,

(Eingegangen am 7. März 1954)

Die Umgestaltung der Sterine auf mikrobiologischem Wege hat in der etzten Zeit sowohl auf theoretischem Gebiet wie auch in der Praxis immer mehr Bedeutung erlangt. Die mikrobiologische Oxydation steroider Alkohole, die Reduktion steroider Ketone und die Oxydation am C-Atom 7, 11 bzw. 16 des Sterinskeletts durch Mikroorganismen hat die Bedeutung derartiger Forschungen erwiesen.

Mit der Oxydation der steroiden Alkohole haben sich als erste *Mamoli* und *Vercellone* [1] beschäftigt. Später stellten *Tak* [2] und besonders *Turfitt* [3, 4, 5, 6] Untersuchungen über die von aus Gartenerde isolierten Mikroorganismen auf die Sterine entfaltete Wirkung an. In früheren Versuchen haben wir [7, 8, 9] auch nachgewiesen, dass durch Mikroorganismen der Sterankern dehydriert bzw. dem C-Atom 7 des Sterinskeletts eine Oxygruppe angelagert und die Seitenkette oxydiert werden kann. Neueren Angaben zufolge [10, 11, 12, 13, 14] kann ausser an das C-Atom 7 des Sterankerns auch dem C-Atom 11 und 16 eine Oxygruppe angelagert werden. Von diesen Beobachtungen haben besonders die das C-Atom 7 bzw. 11 betreffenden Oxydationsprozesse — insbesondere bei der Vereinfachung der Synthese des Vitamin D_3 und des Nebennierenrindenhormons — auch praktische Bedeutung.

Die bisherigen Ergebnisse sind aber noch unbefriedigend, und zwar einerseits weil ein Teil der benutzten Stämme nach einiger Zeit seine Aktivität verliert [5, 16], und andrerseits, weil die mit den in der Literatur erwähnten Stämmen erzielte prozentuale Ausbeute — trotzdem schon ansehnliche Werte erreicht werden — den gestellten Forderungen noch nicht entspricht. Daher ist auch weiterhin eine systematische Stammforschung nötig.

Bisher bediente man sich im allgemeinen der Methode der «enrichment cultures» [2, 5, 14], die im wesentlichen darin besteht, dass aus mit Erdfiltrat beimpften synthetischen Nährböden nach einer gewissen Inkubationszeit auf, frische Nährböden überimpft und diese Überimpfung dreimal wiederholt wird. Aus der letzten Kultur werden dann die einzelnen Stämme isoliert und separat auf den Originalnährboden überimpft. Als C-Quelle wird ausschliesslich Choleterin bzw. die zu untersuchende Steranverbindung benutzt.

Die Nachteile der Methode sind folgende :

1. Die wiederholte Überimpfung sowie die Untersuchung der Reinkulturen bedeutet einen grossen Zeitverlust.

2. Häufig kommt es vor [5], dass die mit der «enrichment cultures»-Methode isolierten Reinkulturen nach ihrer Überimpfung auf frische Nährböden die betreffenden Sterinderivate nicht mehr zerlegen, was bedeutet, dass diese Stämme wahrscheinlich die beim Abbau des Ausgangsmaterials durch andere Mikroorganismen entstandenen Zerfallsprodukte weiter zerlegen. Hierbei bleibt es aber fraglich, wann der betreffende Stamm in die Kette der Sterinoxydation eintritt.

Ferner ist mit der obigen Methode auch der Grad der Oxydation nicht festzustellen, d. h. ob das Steranskelett selbst intakt bleibt oder ob es in kleinmolekuläre Abbauprodukte zerfällt.

Man hat dem Nährboden ausser dem zu untersuchenden Sterin auch noch andere C-Quellen beigefügt und so dafür gesorgt, dass die Sterinoxydation einen sekundären enzymatischen Prozess darstelle, d. h. dass das angewandte Sterin nicht für die vitalen Bedürfnisse der Mikroben verbraucht werde. Der grösste Fehler dieses Verfahrens ist seine Langwierigkeit, da der Nährboden nur mit Reinkulturen beimpft werden darf. Würde man seine Beimpfung nämlich mit Erdfiltraten vornehmen, so würde schwer zu ermitteln sein, welche von den zahlreichen auf dem Nährboden zur Entwicklung gelangenden Mikroorganismen das Sterin oxydierten. Zur Behebung dieser Schwierigkeiten haben wir ein neues Verfahren zur Isolierung sterinzersetzender Stämme ausgearbeitet, das auf der Erkenntnis beruht, dass im allgemeinen die Oxydationsprodukte der Sterine im Ultraviolettlicht chromatographiert werden können. Das Verfahren ist folgendes :

In Petri-Schalen werden Silikagel-Platten hergestellt und nach Sterilisierung mit 3—6 ml steriler Mineralsalzlösung benetzt. Die Nährlösung bestand aus :

NH_4NO_3	4,0	g
K_2HPO_4	0,5	g
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,25	g
NaCl	0,05	g
$FeSO_4$	0,01	g
$MnSO_4$	0,01	g
$CaCl_2$	0,001	g
$ZnSO_4$	0,001	g

+ 100 ml dest. Wasser.

Der Silikagel-Nährboden wird mit sterilem Cholesterin bestreut und mit dem Erdfiltrat (bzw. den zu untersuchenden Proben) beimpft. Die Kulturen werden bei 25° C inkubiert und die Entwicklung der Mikroorganismen täglich

kontrolliert. Nach ihrem Erscheinen werden sie auf Schrägagar überimpft und die Stämme nach Verlauf von etwa 10—14 Tagen Inkubationszeit auf ihre sterinoxydierende Fähigkeit geprüft. Ist die aufgetragene Sterinschicht völlig verschwunden, so ist sie von der Kultur während ihres Metabolismus vollkommen verbraucht worden. Ist dies nicht der Fall, so wird auf die Silikagelplatte eine dünne Schicht Aluminiumoxyd gestreut, die Kolonien mit einem organischen Lösungsmittel beträufelt und auf Grund der im Ultraviolettlicht wahrnehmbar werdenden, um die Kolonien entstehenden farbigen Ringe festgestellt, ob auf die Wirkung der betreffenden Mikroorganismen Oxydation stattgefunden hat. So werden also von den in den Petri-Schalen entstandenen Kolonien nur diejenigen der zuvor schon auf Schrägagar überimpften Kulturen eingehend weiter untersucht, deren Sterinzerlegungsvermögen schon bei der Chromatographie offenbar wurde. Der Nährboden muss aber nicht unbedingt eine Sterinverbindung sein, als C-Quelle können statt dem Silikagel auch beliebige andere Nährböden verwendet werden. Dann wird das zu untersuchende Material mit einem Benetzungsagens (z. B. 1 : 7000 verdünnte Natriumsulfolauratlösung) emulgiert und sterilisiert, die Emulsion zu dem sterilen Nährboden gegeben und nach gutem Durschschütteln zu Platten ausgegossen. Auf diese Weise wird der zu untersuchende Stoff im Nährboden sehr gleichmässig verteilt, während andernfalls, wenn die Sterilisierung zusammen mit dem Nährboden erfolgt, die Sterine verklumpen und beim Plattengiessen auf eine Stelle geraten.

Es kann auch so vorgegangen werden, dass man — ähnlich wie bei der Silikagel-Methode — das fein pulverisierte Aluminiumoxyd auf den bereits erstarrten Nährboden streut und ihn dann mit dem Erdfiltrat beimpft. Es empfiehlt sich, bei der Überimpfung eine Verdünnungsserie herzustellen, weil unter Umständen viele Kulturen auswachsen, die zum grossen Teil überhaupt nicht an der Sterinoxydation teilnehmen, die Untersuchung aber störend beeinflussen. Von den entstandenen Kolonien werden nur diejenigen untersucht, die sich in entsprechender Entfernung voneinander entwickelt haben. Hier wird beim Chromatographieren um die einzelnen Kolonien ringartig etwas Aluminiumoxyd (z. B. Brockmann III. Qual.) in gleich hoher Schicht gestreut. Dann wird die Kultur und der darunter befindliche feste Nährboden (der innerhalb des Aluminiumoxydringes liegende Teil) aufgestochert, um die Sterinderivate lösen zu können. Dies ist natürlich nur dann erforderlich, wenn bei der Zubereitung des Nährbodens das zu untersuchende Sterin den übrigen Zutaten untermengt und nicht auf den schon erstarrten Nährboden gestreut wurde. Die Untersuchung im Ultraviolettlicht geschieht hier auf die gleiche Weise wie oben beschrieben.

Der Vorteil unserer Methode ist, dass

1. auf ein und derselben Platte mehrere Stämme gleichzeitig untersucht werden können und

2. das Eintreten der einzelnen Stämme in die Oxydationskette verfolgt werden kann.

Wächst nämlich eine Kultur erst einige Tage später neben einer anderen heraus, so kann diese offensichtlich nicht das Ausgangsprodukt, sondern nur deren Abbauprodukte verbrauchen.

Eine Ausnahme bilden natürlich solche Stämme, die zu ihrer Entwicklung längere Zeit beanspruchen.

3. Im Laufe des Versuches kann auch sofort festgestellt werden, ob die fraglichen Mikroorganismen das untersuchte Material restlos verbraucht haben.

4. Es können sterinoxydierende Stämme auch von solchen Nährböden binnen relativ kurzer Zeit isoliert werden, in denen das Sterin nicht die einzige C-Quelle darstellt.

Bei der Anwendung dieser Methode dürfen aber auch ihre Nachteile nicht ausser acht gelassen werden :

1. Da nicht alle Sterinderivate im Ultraviolettlicht Farbringe zeigen, kann das Verfahren nicht als exakt bezeichnet werden, was sich aber in unserem Falle nicht störend auswirkt, da die uns wichtigen Oxydationsderivate für die chromatographische Untersuchung geeignet sind.

2. Falls die Mikroorganismen in den Eluierungsmitteln lösliche Pigmente bilden, so wird dadurch der Nachweis der Abbauprodukte behindert. Bei der Durchführung der Stammsammlung empfiehlt es sich, die sterinoxydierenden Stämme in extremen Fundorten entstammenden Erdproben zu suchen, da sich herausgestellt hat [16], dass von den aus verschiedenen Erdbodentypen isolierten, Antibiotika produzierenden Stämmen diejenigen ihr Produktionsvermögen — auch nach mehrmaliger Überimpfung — beibehielten, die Erdproben entnommen worden waren, welche für die Züchtung von Mikroorganismen ungünstige Bedingungen bieten.

Die bekanntgegebene Methode soll in Zukunft hauptsächlich zur Sammlung von sterinoxydierenden Proactinomyces- und Mucor-Arten zwecks Oxydation des 7 und 11 C-Atoms am Sterinskelett herangezogen werden.

LITERATUR

1. *Mamoli, L.* und *Vercellone, A.:* Ber. d. dtsch. Chem. Ges. **71,** (1938), 152, 1686.
2. *Tak, J. D.:* Antony van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol. **8,** 32 (1942).
3. *Turfitt, G. E.:* Biochem. J. (Brit.) **38,** 492. (1944).
4. *Turfitt, G. E.:* Biochem. J. (Brit.) **40,** 79 (1946).
5. *Turfitt, G. E.:* J. Bact. **47,** 487, (1944).
6. *Turfitt, G. E.:* J. Bact. **54,** 557 (1947).
7. *Horváth, J.* und *Krámli, A.:* Nature (Brit.) **160,** 639 (1947).
8. *Krámli, A.* und *J. Horváth:* Nature (Brit.) **162,** 619 (1948).
9. *Krámli, A.* und *J. Horváth:* Nature (Brit.) **163,** 219 (1949).
10. *Morton, R. A., M. Glover* und *J. Glover:* Bioch. J. **51,** 1 (1952).
11. *Peterson* und *Murray:* J. Am. Chem. Soc. **74,** 2381 (1952).
12. *Colingworth, Brunner* und *Haines:* J. Am. Chem. Soc. **74,** 2381 (1952).
13. *Perlman* et al.: J. Am. Chem. Soc. **74,** 2126 (1952).
14. *Fried* et. al.: J. Am. Chem. Soc. **74,** 3962 (1952).
15. *Kahnt, F. W., Meystre, Ch. Neher, R. Wischer E.* und *Wettstein, A.:* Experientia **8,** 422 (1952).
16. *Schatz, A., Savard, K.* und *Pintner, I. J.:* J. Bact. **58,** 117 (1949).

ПРОСТЫЕ МЕТОДЫ СЕЛЕКЦИИ СТЕРИНОКИСЛИТЕЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

А. Крамли, Г. Пулаи и Я. Лантош

Резюме

Окисление и редукция соединений стеранного построения микробиологическим путем имеет особое значение в синтетическом производстве стероидных гормонов. Этот метод с большим успехом применяется при производстве тестостерона, где с помощью коринебактерий, культивированных при дрожжах, представляется возможность превращения одной фазой дегидроандростерона в тестостерон. Согласно исследованиям Хорвата и Крамли, с помощью штамма Proactinomyces roseus в 7. углеродный атом стеранной структуры можно включить группу OH; Петерсон и его сотрудники включили в 11. углеродный атом группу OH культурами Risopus. Первое наблюдение имеет значение при синтезе витамина D_3, а второе — при синтезе кортизона.

Вышеуказанные результаты потребовали разработку такого метода, с помощью которого представляется возможность быстрого определения: годен ли какой-нибудь микроорганизм для окисления соединений стеранного построения или нет.

При разработке упомянутого метода авторы исходили из того наблюдения, что образующиеся в процессе окисления стероидные кетоны, адсорбированные окисью алюминия, при ультрафиолетовом облучении флуоресцируют различными цветами. Следовательно, если на твердую среду — единственным источником углерода которой служит исследуемый стерин — сделаем посев почвенного фильтрата, появляющиеся колонии покроем тонким слоем окиси алюминия и затем обрызгаем органическим растворителем, то на месте тех колоний, где произошло окисление, будут видимы цветные кольца. Таким образом, сделав предварительно пересев из выросших колоний, будет возможность селекции пригодных для окисления стерина штаммов. Для селекции штаммов авторами обычно применялась среда из силикагеля или агар, в которых с помощью малого количества сульфолаурата натрия взвешивали колестерин.

IMMUNISIERUNG VON LABORATORIUMSTIEREN MIT DEM VIRUS DER AUJESZKYSCHEN KRANKHEIT NACH DESSEN INAKTIVIERUNG MIT ULTRAVIOLETTSTRAHLEN

Von
I. BÉLÁDI und G. IVÁNOVICS

Institut für Mikrobiologie der Medizinischen Universität, Szeged

(Eingegangen am 25. März 1954)

Im Laufe unserer seit Jahren durchgeführten Untersuchungen über die biologischen Eigenschaften des Virus der Aujeszkyschen Krankheit (im nachstehenden Ay-Virus) zeigte sich die Notwendigkeit, Laboratoriumstiere gegen diesen Krankheitserreger wirksam aktiv zu immunisieren. Die in der Literatur vorkommenden Angaben boten leider bei dieser Aufgabe nur wenig Hilfe und erbrachten höchstens den Beweis, dass auf diesem Gebiete mit zahlreichen Schwierigkeiten zu rechnen ist. Die Mitteilungen von *Zwick* und *Zeller* [1] sowie von *Gerlach* und *Schweinburg* [2, 3, 4] berichten über die Schwierigkeiten, die bei der Immunisierung von Kaninchen bestehen. Sie fanden hierzu das inaktivierte Virus als vollständig ungeeignet, bei Verwendung von infektionsfähigem Virus gelang es ihnen — wie vorsichtig sie auch immer die Immunisierung in Angriff nahmen — sozusagen bloss ausnahmsweise, manchmal ein Tier so zu infizieren, dass es, wenn es nicht einging, nach der Infektion über eine Immunität verfügte.

Das Schwein erträgt — wie dies aus den Arbeiten von *Köves* und *Hirt* [5] auch in Einzelheiten bekannt ist — die Infektion mit dem Ay-Virus recht gut und wird danach stark immun. Auch einige Laboratoriumstiere können so infiziert werden, dass sie — wenngleich mit grossen Verlusten — die Krankheit überstehen und daraus immun hervorgehen. Laut *Jonesco* und *Olarm* [6] kann man Hunde mit infektionsfähigem Ay-Virus erfolgreich immunisieren; leider sagt jedoch ihre Arbeit nur wenig über das von ihnen angewandte Verfahren aus. Auch wir selber versuchten lange Jahre hindurch, Meerschweinchen und Kaninchen mit lebendem Virus aktiv zu immunisieren, doch endete jeder Versuch, wie vorsichtig immer auch die Infektionsdosis erhöht wurde, mit dem Tode der Tiere. *Koch* und *Ábrahám* [7] erzielten gewisse Ergebnisse, indem sie Ratten mit ansteigenden Dosen eines infektionsfähigen Virusmaterials beimpften. Mehr als sechs Monate alte Ratten konnten auf diese Weise ohne grössere Verluste immunisiert werden, während die jüngeren Tiere fast ausnahmslos zugrunde gingen.

Nach den obigen Ergebnissen hat es den Anschein, als ob die Antigeneigenschaft des Ay-Virus sehr labil wäre und als ob bereits schwache chemische Schä-

digungen zu ihrer völligen Unwirksamkeit führten. Aus diesem Grunde war unser Bestreben darauf gerichtet, eine milder wirkende Inaktivierungsmethode zu finden, so dass versucht wurde, die Aufgabe durch Anwendung von ultravioletten (im weiteren UV) Strahlen zu lösen. Aus den nachstehenden Ausführungen geht hervor, dass das mit UV-Strahlen behandelte Ay-Virusmaterial seine immunogene Eigenschaft bewahrt und sowohl zur Immunisierung von Meerschweinchen wie auch von Mäusen und Kaninchen geeignet ist.

Methodik

Gewinnung des Virusmaterials: Es wurde ein auf die bereits beschriebene Weise [8, 9] in Gewebesuspensionen von Hühnerembryonen gezüchtetes Virusmaterial benutzt. Den verwendeten, mit Ay XXV bezeichneten Stamm stellte uns liebenswürdigerweise Prof. *G. Hirt* zur Verfügung. Das Virus wurde eine lange Zeit hindurch durch dreitägige Überimpfungen auf Gewebekulturen aus Hühnerembryonen gezüchtet. Die Kulturen wurden in Erlenmeyerkolben von 100 ml oder 1 l hergestellt, wobei im ersteren Falle 200 mg Gewebebrei in 4 ml Nährlösung, im letzteren Falle 2000 mg Gewebebrei in 40 ml Nährlösung suspendiert wurden. Die Züchtungsdauer betrug 72 Stunden bei 37°C.

Bestimmung der Infektionsfähigkeit des Virusmaterials: Die Kulturen wurden im Mörser homogenisiert und 10 Minuten lang mit etwa 2000 U/Min. zentrifugiert. Der so gewonnene Extrakt stellte das verwendete Virusmaterial dar, dessen Titrierung auf zweierlei Weise durchgeführt wurde: entweder mit Herzmuskelexplantaten von Hühnerembryonen auf Grund der zytopathogenen Eigenschaft des Virus [8] oder durch intrazerebrale Beimpfung von Mäusen. Im letzteren Falle wurden mit je 0,03 ml des verdünnten Virusmaterials Gruppen von je vier Mäusen infiziert. Die Tiere wurden 12 Tage unter Beobachtung gehalten und bei ihrem Eingehen stets die früheren geschilderten Erkenntnisse berücksichtigt, denen zufolge die pathologische Eigenschaft des an das Hühnerembryonengewebe adaptierten Virus sich sowohl in bezug auf die Inkubationszeit als auch auf die Krankheitssymptome von jener des in Säugetieren durch Passagen erhaltenen Virusmaterials unterscheidet [9].

Nach der 70.—80. Gewebekulturpassage hatten sich die Eigenschaften des Virus stark gefestigt und ausserdem enthielten die Kulturen auch eine bedeutende Menge Virus. Das aus den Gewebekulturen gewonnene Virusmaterial führte noch nach Verdünnungen von 10^{-4}—10^{-5} den Tod der intrazerebral beimpften Mäuse herbei. Bei Titrierung in Gewebekultur erwies es sich in der Regel bis zu Verdünnungen von 10^{-6} oder noch höher als infektionsfähig. Wenn man auf dieser Grundlage rechnet, dann ergibt sich, dass 4 ml Extrakt einer 200 mg Gewebe enthaltenden Kultur 30—50 Millionen DL_{50} enthielt. Bezieht man dies auf Trockenmaterial, so kommt man zum Ergebnis, dass die Viruskonzentration um ein Vielfaches grösser ist als in den aus den Organen infizierter Tiere gewonnenen Extrakten.

Bestimmung des Immunstoffes: Der Immunstoffgehalt des Blutserums der immunisierten Tiere wurde nach halbstündiger Inaktivierung bei 56°C bestimmt. Als Kontrolle wurde mit Hitze behandeltes Blutserum von nicht immunisierten Individuen derselben Tierrasse verwendet.

Wenn das Neutralisationsvermögen des Serums mit Hilfe von Gewebekulturen gemessen wurde, dann wurde aus dem virushaltigen Extrakt eine Verdünnungsreihe von 1 : 10, 1 : 100, 1 : 1000 usw. bereitet, danach zu 1,8 ml der verdünnten Serien jeweils 0,2 ml konzentriertes Serum hinzugefügt und in jedes Reagensglas 6—8 Stückchen fein zerschnittener Hühnerembryonen-Herzmuskel gegeben. Nach 72stündiger Inkubation bei 37° C wurden — auf die bereits ausführlich geschilderte Weise — aus jeder Verdünnung 4 oder 5 Explantate hergestellt. Als Infektionstiter wurde hierbei jene grösste Verdünnung des Virusmaterials angesehen, die an zumindest der Hälfte der auf die erwähnte Weise hergestellten Hängetropfen-Gewebekulturen eine zytopathogene Wirkung auslöste [10].

Die Neutralisationsproben erfolgten an Mäusen mit Verdünnungen des Virusmaterials von 1 : 5, 1 : 50, 1 : 500 usw., denen man ebenso viel Blutserum hinzufügte, worauf das Gemisch eine halbe Stunde vor dem Impfen auf 37°C gehalten wurde. Auf Grund der an je vier Tiergruppen vorgenommenen Titrierungen wurden die Werte von DL_{50} nach der Methode von *Reed* und *Muench* [11] berechnet. Der Quotient der Werte des Immunserums und des Kontrollserums ergab den Neutralisationsindex.

Versuchsergebnisse

Inaktivierung des Virus durch UV-Bestrahlung. Aus dem auf obige Weise hergestellten Virusmaterial wurden Mengen von je 2,5 ml in Petrischalen von 10 cm Durchmesser eingemessen und aus 45 cm Entfernung mit einer Quecksilberlampe Fabrikat Hanau (Type : Höhensonne S 300) bestrahlt. Während dieser Bestrahlung wurde das Virusmaterial ständig mit einem Glasstäbchen umgerührt. Auf Grund der Untersuchung der Infektivität des verschieden lange bestrahlten Virusmaterials konnte festgestellt werden, dass wenn die Gewebekultur dem ursprünglichen Verfahren entsprechend mit Phenolrot enthaltender Simms-X_6-Lösung bereitet wurde, zur vollständigen Inaktivierung des farbstoffhaltigen Virusmaterials eine verhältnismässig lange Zeit notwendig war. Aus diesem Grunde wurde im weiteren der Nährlösung kein Phenolrot mehr zugegeben, wodurch die notwendige UV-Menge — wie aus Tabelle I ersichtlich — auf die Hälfte gesenkt werden konnte.

TABELLE I

Inaktivierung des Ay-Virus durch UV-Bestrahlung

Das aus der 91. Passage gewonnene Virusmaterial mit einem zytopathogenen Titer von 10^{-6} wurde in Anwesenheit und Abwesenheit von Phenolrot mit UV-Strahlen behandelt. Die Infektivität der im Verhältnis von 1 : 10 verdünnten, zu verschiedenen Zeitpunkten genommenen Proben wurde in Gewebekulturen festgestellt.

Bestrahlungszeit (Min.)	Infektivität	
	In Gegenwart von Phenolrot bestrahlt	Ohne Farbstoff bestrahlt
1	+	+
3	+	+
5	+	—
8	+	—
10	—	—

+ = das im Verhältnis von 1 : 10 verdünnte Virusmaterial zeigte nach UV-Bestrahlung eine zytopathogene Wirkung.

Eine mehrfache Wiederholung des in der Tabelle angegebenen Versuches — wobei natürlich die Nährlösung keinen Farbstoff mehr enthielt — zeitigte gleiche oder sehr ähnliche Ergebnisse. Es bedurfte einer Bestrahlung von 5 Minuten, um zu erreichen, dass das im Verhältnis 1 : 10 verdünnte Virusmaterial keine Infektivität mehr besitze. Da das Bestreben auf vollständige Aufhebung der Infektivität gerichtet war, wurde das bestrahlte unverdünnte Material durch intrazerebrale Beimpfung von Mäusen kontrolliert. Hierbei konnte festgestellt

werden, dass noch 25—50% der mit dem 5 Minuten lang bestrahlten, unverdünnten Material beimpften Mäuse eingingen. Deswegen wurde, um ganz sicher zu gehen, die Bestrahlungszeit auf 10 Minuten erhöht. Ein solches Virusmaterial wurde vierundzwanzigmal hergestellt und seine Infektivität jeweils durch intrazerebrale Beimpfung von Mäusen nachgeprüft, wobei es sich in jedem Falle herausstellte, dass es inaktiv war. Das inaktivierte Virusmaterial wurde bis zu seiner Verwendung bei einer Temperatur von — 15°C gelagert.

Immunisierung von Meerschweinchen. Auf Grund von Vorversuchen an kleineren Tiergruppen wurden die Ungefährlichkeit des Verfahrens und die immunogene Wirkung des Impfgutes festgestellt. Danach wurde folgender Versuch ausgeführt:

Es wurden 27 Meerschweinchen von 300—700 g Körpergewicht am 12. X. 1953 mit je 0,5 ml inaktiviertem Virus subkutan und dann am 17. X. mit je 0,5 ml, am 22. X. mit je 1 ml und am 28. X. mit je 1,5 ml intraperitoneal beimpft. Während der Immunisierungszeit ging kein einziges Tier verloren. Der Virusgehalt des zur Impfung verwendeten Virusmaterials betrug — auf Grund der vor seiner Inaktivierung durch intrazerebrale Beimpfung von Mäusen durchgeführten Messungen — $10^{4,7}$ DL_{50}. Seine Infektivität war in Gewebekulturen bis zu einer Verdünnung von 10^{-6} wahrnehmbar. Das inaktivierte Material enthielt also ursprünglich $3{,}3 \cdot 10^{5,7}$ S 154. DL_{50}. Demgemäss erhielt jedes Meerschweinchen im Laufe der Immunisierung eine Virusmenge, die etwa Millionen DL_{50} für Mäuse entsprach. Am 21. Tage nach der letzten Impfung (am 18. XI.) wurde den Tieren mit Hilfe von Herzpunktion Blut entnommen. Leider gingen als Folge dieses Eingriffes 3 Tiere ein. Der Immunstoffgehalt des Blutserums sämtlicher 27 Tiere wurde in Gewebekulturen, das Serum von 23 Tieren ausserdem auch durch Impfung von Mäusen titriert. Als Beispiel für die mit Hilfe von Mäusen vorgenommene Titrierung diene der Fall des immunisierten Meerschweinchenserums Nr. 49, der in Tabelle II gezeigt wird.

TABELLE II

Immunwirkung des Blutserums von immunisierten Meerschweinchen bei Titrierung in Mäusen

Serum	Verdünnungen des Virus						DL_{50}	Neutralisationsindex
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}		
Normales Tier (Kontrolle)	—	—	4/4	4/4	4/4	2/4	10^{-6}	1700
Immunisiertes Tier Nr. 49	4/4	3/4	2/4	0/4	—	—	$10^{-2,77}$	

Der Zähler gibt die Zahl der eingegangenen, der Nenner die Zahl der beimpften Tiere an.

Sämtliche 27 Serumproben wurden mit Hilfe von Gewebekulturen gleichzeitig titriert, während die Kontrolle an Mäusen bei zwei verschiedenen Ge-

legenheiten erfolgte, wobei die Sera in zwei Gruppen eingeteilt wurden. Die diesbezüglichen Ergebnisse sind in Tabella III zusammengefasst.

TABELLE III

Gehalt des Blutserums von immunisierten Meerschweinchen an virusneutralisierendem Immunstoff

Bezeichnung des immunisierten Meerschweinchens	Zytopathogener Titer in Gegenwart von 10% Serum (Kontrolltiter: 10^{-1})	Wert von DL_{50} bei Mäusen		Neutralisationsindex
		bei Normalserum	bei Immunserum	
99	10^{-3}	10^{-6}	$10^{-4.33}$	46
19	10^{-2}	10^{-6}	$10^{-3.50}$	316
40	10^{-2}	10^{-6}	$10^{-3.33}$	468
43	10^{-3}	10^{-6}	$10^{-3.31}$	500
173	10^{-2}	10^{-6}	$10^{-3.23}$	590
179	10^{-2}	10^{-8}	$10^{-3.00}$	1000
147	10^{-1}	10^{-6}	$10^{-3.00}$	1000
157	10^{-2}	10^{-6}	$10^{-3.00}$	1000
67	10^{-1}	10^{-8}	$10^{-3.00}$	1000
48	10^{-2}	10^{-8}	$10^{-3.00}$	1000
86	10^{-1}	10^{-6}	$10^{-3.00}$	1000
49	10^{-1}	10^{-6}	$10^{-2.77}$	1700
115	$<10^{-1}$	10^{-6}	$10^{-2.77}$	1700
21	$<10^{-1}$	10^{-6}	$10^{-2.50}$	3160
47	10^{-1}	10^{-6}	$10^{-2.33}$	4680
187	$<10^{-1}$	10^{-6}	$10^{-2.00}$	10000
194	$<10^{-1}$	10^{-6}	$10^{-1.5}$	31600
65	10^{-1}	$10^{-6.33}$	$10^{-3.00}$	2140
152	10^{-1}	$10^{-6.33}$	$10^{-2.69}$	4370
193	$<10^{-1}$	$10^{-6.33}$	$10^{-2.49}$	6900
39	$<10^{-1}$	$10^{-6.33}$	$10^{-2.23}$	12600
29	$<10^{-1}$	$10^{-6.33}$	$10^{2.23}$	12600
98	$<10^{-1}$	$10^{-6.33}$	$10^{-1.50}$	67700
69	10^{-2}		nicht untersucht	
159	10^{-2}		nicht untersucht	
50	10^{-1}		nicht untersucht	
113	10^{-1}		nicht untersucht	

10^{-1} bedeutet, dass Virusmaterial in einer Verdünnung von 1 : 10 keine zytopathogene Wirkung in Gegenwart von Immunserum besass.

Aus dieser Tabelle geht klar hervor, dass im Blute der immunisierten Tiere eine bedeutende Menge virusneutralisierenden Immunstoffes vorhanden ist. Zwischen der Neutralisierung der zytopathogenen Wirkung und der mäuse-

schützenden Wirkung der Seren lässt sich eine Parallele feststellen, wobei natürlich eine gewisse Versuchsfehlermöglichkeit zu berücksichtigen ist. Da die Versuchsfehlergrenze des zytopathogenen Titers nicht grösser als der Exponent eins ist, pflegt man eine solche Abweichung nicht in Betracht zu ziehen. Ausserdem ist auch mit dem Fehler der an den Mäusen vorgenommenen Titrierung zu rechnen, der maximal ebenfalls die Grösse des Exponenten eins erreicht. Trotz der Möglichkeit dieses grossen Fehlers lässt sich indessen eine gute Parallele zwischen den beiden Wertbestimmungen ziehen.

Als Fortsetzung des Versuches wurden die Tiere am 30. XI. 1953, also am 12. Tage nach der Blutentnahme bzw. 33 Tage nach der letzten Impfung, mit je 1 ml inaktiviertem Virusmaterial wiederum beimpft. Am 20. Tage nach der Blutentnahme erhielten dann die 23 immunisierten Tiere (eines ging aus interkurrenten Gründen ein) in zwei Gruppen — gleichzeitig mit einer entsprechenden Zahl von Kontrollmeerschweinchen — subkutan je 0,5 ml der Verdünnungen des aktiven Virus. Die Ergebnisse sind in Tabelle IV angeführt.

TABELLE IV

Infektion von immunisierten und Kontrollmeerschweinchen mit verschiedenen Virusmengen

Verabreichte Verdünnung (0,5 m)	Immunisierte Tiere	Kontrolltiere	
		Verhältnis der eingegangenen Tiere	Lebensdauer der eingegangenen Tiere (Tage)
10^{-1}	—	4/4	3, 3, 4, 4
10^{-2}	0/11	4/4	4, 4, 5, 7
10^{-3}	0/12	4/4	6, 6, 6, 8
10^{-4}	—	2/4	8, 8
10^{-5}	—	0/4	—

Der Zähler gibt die Zahl der eingegangenen, der Nenner die Zahl der geimpften Tiere an.

Aus der Tabelle ist ersichtlich, dass kein einziges der immunisierten Tiere verloren ging. Dieser Versuch gibt keine genaue Auskunft über das Ausmass der Immunität, da in der mit einer Verdünnung von 10^{-2} infizierten Gruppe kein Verlust eintrat, woraus der Schluss gezogen werden kann, dass die Tiere — bzw. zumindest ein Teil von ihnen — sogar gegen eine noch grössere Infektion als diese resistent gewesen sein dürften. Demgemäss erwiesen sie sich also 100 DL_{50} gegenüber als immun, doch ist es wahrscheinlich, dass ihre Immunität noch grösser war.

Hier sei noch erwähnt, dass die Tiere nach Ablauf der Beobachtungszeit aufs neue infiziert wurden und dass durch diese Hyperimmunisierung eine sehr grosse Immunität erreicht wurde. Schliesslich trat auch unter den mit konzentriertem Virusmaterial (100 000 DL_{50}) reinfizierten Tieren kein Verlust ein.

Hyperimmunisierung mit dem ersten infektiösen Virusmaterial steigerte in bedeutender Weise die Grundimmunität, die von dem durch UV-Bestrahlung inaktivierten Material gewährt wurde. Ausser den obenerwähnten Angaben weist darauf auch die Erhöhung des Wertes des Neutralisationsindexes hin. In Tabelle V sind die Neutralisationswerte des Blutserums von vier, zuerst mit inaktiviertem Virus und dann mit infektionsfähigem Material beimpften Meerschweinchen angegeben. Die Wertbestimmung des Immunstoffes erfolgte durch intrazerebrale Beimpfung von Mäusen.

TABELLE V

Neutralisationsindex des Blutserums von hyperimmunisierten Meerschweinchen

Bezeichnung des Meerschweinchens	Neutralisationsindex	
	nach Grundimmunisierung	nach Hyperimmunisierung
19	317	1700
179	1000	10000
48	1000	10000
65	2140	4680

Der Neutralisationsindex wurde durch intrazerebrale Beimpfung von Mäusen gemessen. Die mit inaktiviertem Virusmaterial immunisierten Tiere («Grundimmunität») erhielten zweimal innerhalb eines Monats je 0,5 ml aktives Virus in einer Verdünnung von 10^{-2} subkutan. Probeblutentnahme nach drei Wochen.

Immunisierung von Mäusen. Mit UV-Strahlen inaktiviertes Virusmaterial wurde einer grösseren Zahl von Mäusegruppen wiederholt intraperitoneal verabreicht. Die Impfungen erfolgten in Abständen von 4—5 Tagen. Zwei bis vier Wochen nach der letzten Impfung wurden die Tiere in zwei Gruppen geteilt und die eine Gruppe intrazerebral und die andere subkutan mit verschiedenen Virusmengen infiziert. Die Ergebnisse dieser mit einer entsprechenden Anzahl von Kontrollen ergänzten Versuche sind in Tabelle VI zusammengefasst.

Es ist ersichtlich, dass der in den einzelnen Versuchen verwendeten Virusmenge entsprechend eine unterschiedlich starke Immunität sowohl gegenüber der subkutanen als auch der intrazerebralen Infektion erzielt wurde. Die dreimal geimpften Mäuse waren etwa 10—100 DL_{50} gegenüber immun, während sich die fünfmal geimpften Gruppen selbst gegen 100—10 000 DL_{50} als resistent erwiesen, wobei ein Teil der Tiere eine sogar noch grössere Widerstandsfähigkeit zeigte (siehe III. Versuch).

Immunisierung von Kaninchen. Mit diesen Tieren wurden nur orientierende Untersuchungen durchgeführt. Wegen der geringen Zahl der zur Verfügung stehenden Tiere ging hierbei das Bestreben dahin, festzustellen, ob das mit UV-Strahlen inaktivierte Virusmaterial die Entstehung eines neutralisierenden

TABELLE VI

Resistenz von intraperitoneal immunisierten Mäusen bei vorhergehender Inaktivierung des verabreichten Virusmaterials durch UV-Bestrahlung

Versuchs Nr.	Immunisierung	Infektion	Tiergruppe	Verabreichte Virusverdünnung							
				10^{-0}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
I.	3×0,2 ml	subkutan	immunisiert	3/4	0/4	—	—	—	—	—	—
			Kontrolle	4/4	3/4	—	—	—	—	—	—
		intra-zerebral	immunisiert	3/4	2/4	1/4	—	—	—	—	—
			Kontrolle	—	4/4	4/4	3/4	—	—	—	—
II.	5×0,5 ml	subkutan	immunisiert	3/6	1/6	0/6	—	—	—	—	—
			Kontrolle	6/6	6/6	6/6	5/6	2/6	—	—	—
		intra-zerebral	immunisiert	—	6/6	6/6	4/6	1/6	—	—	—
			Kontrolle	—	—	6/6	6/6	6/6	5/6	—	—
III.	5×0,5 ml	subkutan	immunisiert	0/8	0/8	0/8	0/8	—	—	—	—
			Kontrolle	—	—	8/8	7/8	2/8	0/8	—	—
		intra-zerebral	immunisiert	—	7/8	7/8	6/8	0/8	0/8	—	—
			Kontrolle	—	—	8/8	8/8	8/8	8/8	3/8	0/8

Immunstoffes im Organismus des Kanichens hervorruft. In einem dieser Versuche wurden zwei Tieren im Laufe von 6 Wochen insgesamt 3,7 ml Impfstoff in 6 Dosen intravenös verabreicht. Am 9. Tage nach der letzten Impfung wurde den Tieren Blut entnommen. Diese Serumproben neutralisierten mehr als eine Million zytopathogener Dosen des Virus. Nach Verabreichung von weiteren je 1 ml wurden die dann entnommenen Serumproben auch an Mäusen titriert. Der Neutralisationsindex dieser Proben betrug 2000 bzw. 4000. Danach erhielten die Tiere zwei Monate keinen Impfstoff. Nach diesen zwei Monaten sanken die vorigen Werte ihrer Sera auf 600 bzw. 900.

In einem anderen Kaninchenversuch wurden vier Tiere immunisiert. Während der drei Monate dauernden Beobachtungszeit erreichte ihr Immunstoff einen beträchtlich hohen Titer. Leider konnten diese Versuche nicht abgeschlossen werden, so dass hier von einer Beschreibung der Einzelheiten abgesehen werden soll.

Lagerungsfähigkeit des inaktivierten Impfstoffes. Es wurde auch der Versuch gemacht festzustellen, ob die Antigenwirkung des mit UV bestrahlten Virusmaterials längere Zeit erhalten bleibt. Ein Teil des zur Beimpfung der in Tabelle III angeführten Meerschweinchen frisch gebrauchten Virusmaterials wurde ohne Zugabe irgendeines Konservierungsmittels in gefrorenem Zustande

3 Monate lang aufbewahrt. Danach wurde es in ähnlicher Weise wie in dem oben beschriebenen Versuch zur Immunisierung von drei Meerschweinchen benutzt. Nach drei Impfungen, am 17. Tage, wurde den Tieren Blut entnommen. Der Neutralisationsindex dieser Sera betrug an Mäusen 1100, 2500 bzw. 6300, d. h. ihr Wert lag in derjenigen Grössenordnung, die im Laufe der Verwendung von nicht gelagertem Impfgut im Durchschnitt beobachtet werden konnte.

Diskussion

Das aus Gewebekulturen gewonnene virenreiche Material verliert — bei Beibehaltung seiner Antigenwirkung — nach UV-Bestrahlung mit Sicherheit seine Infektivität. Die hier beschriebenen Versuche beweisen in überzeugender Weise, dass bei Anwendung eines solchen Virusmaterials Meerschweinchen und Mäuse ohne Tierverlust immunisiert werden können. Die mit inaktiviertem Virusmaterial beimpften Tiere lassen sich durch Impfung mit infektiösem Virusmaterial äusserst erfolgreich hyperimmunisieren und können so gegen letale Dosen von mehr als zehntausend und noch mehr resistent gemacht werden.

Die Immunität der Tiere wird — ausser durch ihre Resistenz — auch durch den in ihrem Blute in grosser Menge vorhandenen virusneutralisierenden Immunstoff bezeugt. Bei der Untersuchung dieses Immunstoffes konnte festgestellt werden, dass die von uns früher ausgearbeitete, auf der Neutralisation der zytopathogenen Wirkung des Virus beruhende, überaus einfache und billige Methode gut übereinstimmende Ergebnisse mit den Neutralisationsindexen liefert, die bei Impfung von empfänglichen Tieren mit dem üblichen Serum-Virus-Gemisch ermittelt werden können.

Es soll hier nicht die Frage der veterinärmedizinischen Bedeutung der Aujeszkyschen Krankheit und im Zusammenhang damit die etwaige Notwendigkeit einer Schutzimpfung gegen diese Krankheit aufgeworfen werden. Falls eine solche Schutzimpfung notwendig ist, so dürften die hier geschilderten Beobachtungen als Grundlage für die Ausarbeitung einer praktischen Impfmethode dienen können. Damit würde natürlich die Klärung von zahlreichen weiteren Fragen notwendig werden, wie z. B. die Technik der grossbetrieblichen Herstellung des Impfstoffes, seine Lagerung, Konservierung usw. Wahrscheinlich dürften aber unsere Forschungsergebnisse bereits die Grundbedingungen für die Klärung dieser Fragen erfüllen, einerseits durch die billige und einfache Herstellung des Virusmaterials und andererseits durch die einfache und billige Titrationsmethode des Virus bzw. des Immunstoffes.

ZUSAMMENFASSUNG

In Gewebesuspensionen aus zerstückelten, gemischten Hühnerembryonen wurde ein stark infektiöses, verhältnismässig reines Virus der Aujeszkyschen Krankheit gezüchtet. Dieses

Virusmaterial verliert — bei Beibehaltung seiner Antigeneigenschaften — nach Bestrahlung mit ultraviolettem Licht seine Infektivität. Mit solchem Virusmaterial können Meerschweinchen und Mäuse sehr gut, ohne jede Impfgefahr immunisiert werden. Die Ausbildung der Immunität geht Hand in Hand mit dem Erscheinen eines virusneutralisierenden Immunstoffes.

LITERATUR

1. *Zwick* und *Zeller:* Arb. Ksl. Gesundheitsamt **36,** 382 (1911).
2. *Gerlach, F.* und *Schweineburg, F.:* Z. Inf. Krkh. Haustiere **48,** 270 (1935).
3. *Gerlach, F.* und *Schweineburg, F.:* Wien. Klin. Wschr. 1379 (1945).
4. *Gerlach, F.* und *Schweineburg, F.:* Wien. Klin. Wschr. 551 (1936).
5. *Köves, J.* und *Hirt, G.:* Arch. Tierheilk. **68,** 1 (1935).
6. *Jonesco, O.* und *Olarm, C.:* Bull. Acad. Med. Roman. **5,** 507 (1942).
7. *Koch, A.* und *Ábrahám, E.:* Acta Vet. Hung. **2,** 271 (1952).
8. *Cserey-Pechány, É., Béládi, I.* und *Ivánovics, G.:* Acta Physiol. Hung. **2,** 229 (1950).
9. *Ivánovics, G., Ábrahám, E.* und *Koch, A.:* Zbl. Bakt. Orig. I. **161,** 3 (1954).
10. *Ivánovics, G., Koch, A.* und *Cserey-Pechány, É.:* Acta Physiol. Hung. **4,** 383 (1953).
11. *Reed, J. J.* und *Muench, H.:* Am. J. Hyg. **27,** 493 (1938).

ИММУНИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ ВИРУСОМ АУЕССКОГО, ИНАКТИВИРОВАННЫМ УЛЬТРАФИОЛЕТОВЫМИ ЛУЧАМИ

И. Белади и *Г. Иванович*

Резюме

Авторы, с помощью ранее разработанного ими метода, для получения вирусного материала пользовались тканевыми культурами из размельченных смешанных тканей куриных зародышей. Экстракты вирусосодержащих тканевых культур сравнительно бедных сушими веществами и обладающих высокой патогенностью, под действием ультрафиолетовых лучей теряют патогенность, но в то же время сохраняют антигенные свойства. Инактивированные ультрафиолетовыми лучами вирусы в замороженном виде сохраняют антигенность в течение долгого времени. Таким вирусным материалом безопасно иммунизировали морских свинок и мышей. В крови подвергнутых нескольким прививкам морских свинок был обнаружен высокий титр вируснейтрализующих антител, и животные стали резистентными к вирусу Ауесского. Иммунитет таких животных может повышаться путем дальнейших прививок активным вирусным материалом. У привитых инактивированным вирусом мышей выработался высокий иммунитет как к подкожному, так и к внутримозговому заражению.

STUDIES ON COXSACKIE VIRUS INFECTIONS IN HUNGARY

I. ISOLATION AND IDENTIFICATION OF COXSACKIE VIRUS STRAINS

By
M. PINTÉR and V. BALÁZS

Institute of Microbiology, University Medical School, Szeged

(Received March 26, 1954)

It has been reported [1] that in the summer of 1952 a pathogenic agent with properties peculiar to Coxsackie virus could be isolated from a child with a clinical diagnosis of abortive poliomyelitis. In further examinations nine more strains were isolated, mostly from children exhibiting the symptoms of one or another form of Coxsackie virus infection. On the basis of virus isolation it could be stated that Coxsackie virus occurs in Hungary, too, and plays in all likelihood the same role as it plays in other countries of Europe. The various strains of Coxsackie virus are known to belong to different serological types. This is significant with respect to epidemiology. Consequently, our primary aim was to examine the isolated strains of virus for their serological properties. It was felt that a comparison of our strains with the standard ones would merit particular attention in view of the fact that in Europe such examinations have been carried out on a limited scale only.

Methods

Isolation of Virus. This was made from faeces in every case. The samples were kept at — 20°C until tested, when a 20 per cent suspension in saline was made from the faecal material. The suspensions were centrifuged at 6000 to 8000 r. p. m. for 30 minutes and to the supernatant 2 mg of penicillin and 2 mg of streptomycin per ml were added. From the material so prepared 0,03 ml doses were injected subcutaneously into 1-or 2-day-old white or brown mice. The strains isolated were stored in the form of a 20 per cent muscle suspension at — 20°C.

Antigen. The antigen for the complement fixation test was prepared by the following method. The infected newborn mice were killed without delay on appearance of paralytic symptoms (usually 48 to 72 hours following infection). The skin, head and internal organs were removed and the torsos were homogenized in a Waring-blendor in four volumes of saline. The 20 per cent suspension so obtained was centrifuged, the supernatant frozen and thawed 4 to 5 times in succession, and centrifuged for 30 minutes at 10 000 r. p. m. The fluid was then used as antigen.

Immune serum. Immune sera for neutralization and complement fixation tests were prepared in the following way. At four-day intervals, adult mice were inoculated intraperitoneally five times with 0,5 ml of the 20 per cent suspension of muscle of infected mice. One week after the last injection the animals were bled by heart puncture. Sera were inactivated at 56°C for 30 minutes and stored in the frozen state.

Complement fixation. The reaction was carried out in 10 mm by 100 mm test tubes, in a total volume of 0,5 ml. The antigen, the serum dilution and the two units of complement (0.1 ml of each) were incubated for 30 minutes in a water bath of 37°C. After adding 0,2 ml of a sensitized sheep erythrocyte suspension (2 per cent erythrocyte suspension plus 4 units of haemolysin), another 30-minute period of incubation at 37°C followed. A reaction of ++ was taken as positive. The specificity of the reaction was controlled by using normal serum and normal antigen.

Neutralization tests. These were usually carried out in the following way. To dilutions of the virus suspension containing 200 LD_{50} per 0,03 ml, an equal volume of serum dilution was added and from this mixture 0,03 ml doses were injected into newborn mice 1 hour later. The infective dose was determined on the basis of the virus titre, which was computed by the Reed-Muench formula.

Standard type strains. The standard strains of Coxsackie virus were obtained from the State Institute for Public Health (Budapest), for which we are indebted to Director A. Havas. The above institute had received the strains from G. Dalldorf (Albany, N. Y., U. S. A.).

Results

The virus isolation experiments were performed during the summer and autumn of 1952, in Szeged. Sixty seven materials were worked up, yielding 10 strains of Coxsackie virus. Clinical diagnosis was abortive poliomyelitis in 2 cases, herpangina in 1, and summer grippe in 5 cases. Two strains were recovered from symptom-free individuals. The patients were all children, 1 to 7 years of age. In the absence of adequate blood samples, part of the patients could only be subjected to complete serological tests. In two cases, sera taken during the acute and the convalescent stages of the disease were examined for neutralization titres against the isolated virus and in both cases appearance of antibodies could be observed. In the rest of the cases only convalescent sera could be examined. All of them displayed high antibody titres against the isolated virus.

The isolated strains produced in mice symptoms and changes peculiar to Coxsackie virus. From the 2nd to 3rd passages on the incubation period lasted 48 to 72 hours, and the animals died shortly after having developed flaccid paralytic symptoms. The virus titre of muscle suspensions from paralyzed animals varied between 10^{-7} and $10^{-8,5}$. Under the microscope, the striated muscle of infected animals showed diffuse degeneration ; the muscle fibres were broken up, with signs of hyaline degeneration ; there were accumulation of connective tissue and slight inflammatory changes.

In the first phase of the investigations the strains isolated were compared to each other, since at that time we did not possess standard type strains. At first, 7 strains isolated from children living in a nursery and exhibiting the symptoms of a mild summer grippe were examined. We prepared immune serum against one of these strains and tested it for neutralization against the other 6 strains.

As shown in Table I, the immune serum diluted 1 : 10 neutralized doses of 10.000 LD_{50} of six of the strains, while with the seventh strain it was ineffective even against a dose of 100 LD_{50}. In further studies two strains (ZsJ and BJ) from among the above seven were compared with three strains isolated elsewhere. Immune sera were prepared against all five strains and were tested, for complement fixation and neutralization.

Table II shows the results of complement fixation tests. These tests were repeated three times, with antigens from different passages. The results were

TABLE I

Neutralization test with ZsJ mouse-immune serum

Serum	Virus LD_{50}	Virus strains						
		ZsJ	SP	MJ	DJ	JE	KE	BJ
ZsJ serum 1 : 10	100	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/6	5/5
	10.000	0/4	0/4	1/5	0/5	0/5	0/6	4/4
Normal mouse serum 1 : 10	100	4/4	5/5	4/4	5/5	5/5	5/5	4/4
	10.000	5/5	4/4	5/5	5/5	5/5	6/6	4/4

Numerator; number of mice succumbed.
Denominator; number of mice inoculated.

TABLE II

Identification of Coxsackie Virus Strains by Complement Fixation Test

Antigen	Immune serum				
	ME	RG	BJ	BZ	ZsJ
ME	20	40	80	—	—
RG	20	80	80	—	—
BJ	40	40	80	—	—
BZ	—	—	—	40	—
ZsJ	—	—	—	—	80

The numbers indicate the highest serum dilution giving a positive reaction.

quite uniform. Cross-neutralization tests were carried out to establish the eventual presence of mixed strains among the above ones. The results completely tallied with the data derived from complement fixation tests. On this basis the five strains were divided into 3 serological types. As strain ZsJ was representative of five more strains, the strains of Coxsackie virus isolated in Szeged were grouped as Type Szeged-1 (BJ) 3 strains; Type Szeged-2 (BZ) 1 strain; Type Szeged-3 (ZsJ) 6 strains.

Next, 3 representative strains of the three types isolated in Szeged were compared by serological methods with the 14 type strains from the Dalldorf laboratory. Of the 14 strains 10 represented the A-group, 4 the B-group. The results of the complement fixation tests by different antigens and immune sera against our own strains is shown in Table III.

The immune sera reacted only with the homologous antigen and with one of the standard antigens. This thought to be sufficient proof of their serolo-

TABLE III

Typing of Coxsackie Virus Strains by Complement Fixation Test

Serum	Antigen															
	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	A_6	A_7	A_8	A_9	A_{10}	B_1	B_2	B_3	B_4	Sz_1	Sz_2	Sz_3
Szeged-1	—	—	—	—	80	—	—	—	—	—	—	—	—	—	80	—	—
Szeged-2	—	—	—	—	—	20	—	—	—	—	—	—	—	—	—	20	—
Szeged-3	—	—	—	80	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	80

Numbers indicate the highest serum dilutions giving positive reactions.

TABLE IV

Typing of Coxsackie Virus Strains by Neutralization Test

Immune serum	100 LD_{50} virus					
	A_4	A_5	A_6	Sz_1	Sz_2	Sz_3
Szeged-1	0	1250	0	1250	0	0
Szeged-2	0	0	1250	0	1250	0
Szeged-3	1250	0	0	0	0	1250

Numbers indicate the highest serum dilutions showing protection.
0 = no neutralization.

gical identity. On this basis, type Szeged-1 is identical with type A_5 (Easton-14), type Szeged-2 with A_6 (Israel-7), and type Szeged-3 with A_4 (Texas-1).

The types identified by complement fixation were further examined in neutralization tests. Since dilutions as high as 1 : 1250 of the immune sera protected against 100 LD_{50} of the corresponding virus, the results of the complement fixation tests may be considered as valid (Table IV).

Discussion

The above isolations of Coxsackie virus make it justified to assume an important role to this pathogenic agent in Hungary. The clinical pictures were similar to those often described in the literature [2, 3]. Apart from abortive poliomyelitis, herpangina and summer grippe, some cases of myalgia were also examined for presence of virus, with no results. We have failed to recover Coxsackie virus from cases of paralytic poliomyelitis.

It has been found that in Szeged, too, the incidence of Coxsackie virus infections showed a close parallelism with the number of poliomyelitis cases.

All our attempts at isolating Coxsackie virus had failed in the years preceding 1952. It is striking that in those years no cases of poliomyelitis but isolated ones had been reported in Szeged, while in 1952, the year of Coxsackie virus isolation, poliomyelitis morbidity was far above the average.

Considering the numerous isolations of Coxsackie virus in recent years, it was necessary to subject the isolated strains to a careful serological study and to determine the incidence of individual types. *Contreras* et al. [4] divided 232 strains isolated in various countries into 16 types and mapped up their spread. Of the strains examined only 2 originated from Europe (France) and these were identified with types A_1 and A_2. Although a large number of strains have been isolated in West-European countries, typing was infrequently made. The occurrence of type A_2 has been demonstrated by *Vivell* and *Schairer* [5], of types A_1, A_2 and A_3 by *Verlinde* and *van Tongeren* [6], and of B_1 by *Schaeffer* [7]. Our studies have revealed that type A_5, a type hitherto isolated only in America, further the types A_4 and A_6, recovered in America and in the Middle East, occur also in Europe.

Investigations into the occurrence of specific antibodies are in progress to determine more closely the spread of Coxsackie viruses in Hungary.

SUMMARY

1. In 1952, 10 strains of Coxsackie virus were isolated in Szeged, from children exhibiting the clinical symptoms of abortive poliomyelitis, or herpangina, or summer grippe.

2. On the basis of complement fixation and neutralization tests, the isolated strains fall into 3 serological types. By the above methods, the strains were compared with 14 standard type strains. Six strains proved to be identical with type A_4, 3 strains with type A_5 and one strain with type A_6.

LITERATURE

1. *Ivánovics, G., Pintér, M.:* Acta Medica Hung. **4,** 157 (1953).
2. *Curnen, E. C., Shaw, E. W., Melnick, J. L.:* J. A. M. A. **141,** 894 (1949).
3. *Huebner, R. J., Cole, R. M., Beeman, E. A., Bell, J. A., Peers, J. H.:* J. A. M. A. **145,** 628 (1951).
4. *Contreras, G., Barnett, V. H., Melnick, J. L.:* J. Immunol. **69,** 395 (1952).
5. *Vivell, O., Schairer, J.:* Arch. Virusforsch. **5,** 84 (1953).
6. *Verlinde, J. D., van Tongeren, H. A. E.:* Antonie van Leuwenhoek **18,** 239 (1952).
7. *Schaeffer, L. F.:* Neeld. Tdschr. Geneesk. **95,** 2938 (1951).

ИЗУЧЕНИЕ ИНФЕКЦИЙ, ВЫЗЫВАЕМЫХ ВИРУСОМ *COXSACKIE* В ВЕНГРИИ

I. Выделение и идентификация штаммов вируса Coxsackie.

М. Пинтер и *В. Балаж*

Резюме

1. Летом и осенью 1952 года авторы в 67 случаях производили опыты выделения вируса Coxsackie в г. Сегед; в результате этих опытов удалось обнаружить 10 штаммов, вызывающих у новорожденных мышат характерные для вируса Coxsackie симптомы и

изменения. Два штамма были изолированы от детей со симптомами абортивного полиомиэлита, один штамм от лечимых с диагнозом герпангины, пять штаммов с диагнозом летнего гриппа и два штамма от бессимптомных детей.

2. На основании реакции нейтрализации и связывания комплемента выделенные штаммы были отнесены к трем серологическим типам.

3. Тождественные обнаруженным в г. Сегед трем типам штаммы были сравнены с 14 типами штаммов Даллдорфа. В результате реакций нейтрализации и связывания комплемента три сегедских типа оказались идентичными типам Даллдорфа A_4, A_5 и A_6.

STUDIES ON THE ENZYME PENICILLINASE

By
L. VÁCZI and J. URI

State Institute for Public Health, Budapest and Institute of Pharmacology, University Medica School, Debrecen

(Received April 12, 1954)

The fact, that the number of penicillin-resistant organisms is steadily rising throughout the world, has directed attention to studies concerned with the penicillin-destroying (penicillinase) enzyme produced by microorganisms.

In 1940, *Abraham* and *Chain*, *E.* [1] found that cultures of *E. coli* contain or produce a substance destroying penicillin. The substance proved to be enzymic in nature and was subsequently termed penicillinase. Further research has confirmed that the enzyme, which may be extra- or intracellular, is being produced also by other microorganisms. Among the bacteria of the *subtilis-mesentericus* group are found the most active extracellular enzyme producers, while the most efficient endo-enzyme producers are certain in vivo highly resistant staphylococci. Having found that penicillinase played an important role in the resistance of bacteria against penicillin and as no procedure has been worked out, which could have been used for inhibiting this enzyme, it seemed worth while to make experiments with the purpose of inhibiting the enzyme, in order to obtain information about its structure from the nature of the effective enzyme inhibitors. Another aim of the investigations was to evaluate the eventual therapeutic significance of enzyme inhibitors and, in this way, to find penicillin preparations which may prove efficient against resistant strains.

In the experiments, isolated exocellular and endocellular enzyme and strains of *Staphylococcus pyogenes* producing penicillinase were used.

Methods

a) *Preparation of endoferment* occurred from a strain of *Staphylococcus pyogenes aureus* resistant *in vivo* against 500 U/ml of penicillin. The strain was grown according to *Gilson* and *Parker* [5] in Kolle flasks, on horse broth agar, for 24 hours at 37°C. After 24 hours the cultures were washed off the Kolle flasks with physiological saline and the washings were centrifuged. Ingredients of the medium were removed by washing three times with chilled physiological saline. To the bacterial mass so obtained acetone of −20°C was added at a ratio of 1 in 7. The mixture was kept at −20°C for 2 hours, then centrifuged and the supernatant decanted. This procedure was repeated 3 times. After that ether cooled to −20°C was added at a ratio of 1 to 7, the mixture was maintained at −20°C for 1 hour, when another ether treatment followed, then another 1 hour period at −20°C. After centrifuging, the extracted bacterial mass was rapidly dried under vacuum. A light yellow powder resulted, which was ground in an achate mortar. This was used as raw enzyme preparation, and was stored in a refrigerator, or at room temperature.

The activity of the preparation was 300 penicillinase units per mg dry substance. One penicillinase unit corresponds to an amount of enzyme which at 37°C breaks down 10 U penicillin to its half in 30 minutes. The enzyme preparation could be stored for several months without substantial loss of activity. Staphylococcus penicillinase is firmly bound to the bacterial protein and on destroying the body protein or the bacterial structure the enzyme also perishes. The enzyme was thermolabile and lost its activity in 5 minutes at 100°C. We have found the enzyme approximately equally active at room temperature and at 37°C.

b) *Preparation of exoferment.* Exocellular penicillinase was derived from *B. subtilis* culture, according to *Henry* and *Housewright* [6]. The ingredients of the medium used were as follows.

casamine (acid-hydrolysed caseine)	1,0	g
NaCl	2,0	g
glucose	0,6	g
K_2HPO_4	0,5	g
KH_2PO_4	0,4	g
$CaCl_2 2H_2O$	0,08	g
$FeSO_4 7H_2O$	0,001	g
$MgSO_4 7H_2O$	0,005	g
$MnSO_4 4H_2O$	0,003	g
distilled water, to	1000	g

125 ml of medium were measured into a 500 ml flask. To each flask 1 g of $CaCO_3$ was added and the medium was inoculated with 3 ml of a 24-hour horse broth B. substilis culture suspension. Simultaneously, 200 U/ml of sodium penicillin were added to the culture and after 24 hours an equal amount of penicillin was added again. After 5 days at 37°C the mixture was centrifuged and the supernatant was used as a raw enzyme preparation. The pH of the supernatant was adjusted to 5,4 with glacial acetic acid. This resulted in precipitation of certain contaminant, non-active proteins. After centrifuging, the clear supernatant was readjusted to pH 6,8 and used as enzyme preparation. The fluid so obtained contained 10,000 U of penicillinase in each ml. The enzyme was not filterable and lost its activity within 5 minutes at 100°C.

Experimental

In a total volume of 1,2 ml, aliquot amounts of the potassium salt of penicillin G were incubated with enzyme and inhibitory substance at pH 7 for 30, 45, and 60 minutes, and samples were examined by the hole-plate method for the amount of penicillin contained. The results obtained were used for estimating the degree of enzyme inhibition.

In group I 44, partly newly synthetized, reducing organic compounds were examined.* These included phenol derivatives, dyes and other compounds of basic character. No detailed list of the compounds examined will be given and in Table I only those exhibiting an enzyme-blocking action are listed.

The above 7 compounds inhibited the endoenzyme in a concentration of 1 : 25,000 or 1:50,000. Considering that the compounds were of different chemical structure and the only common property they possessed was their marked reducing capacity, this reducing action is thought to account for their capability of reducing the enzyme. Further studies on these substances were, however, not performed, as they are all cell poisons and as such may not be used in therapy.

* The authors are indebted to prof. Dr. A. Jeney and Dr. T. Zsolnay by whom the compounds were synthetized in the Institute for Microbiology, University Medical School, Debrecen.

TABLE I

Effect of various substances on endocellular penicillinase

Substance examined	Concentration tested	Effect
2-3 dichlor-1-4 naphthochinone	1 : 50,000	+
phenylhydrazine chlorhydrate	1 : 25,000	+
furan α-carbonic acid hydrazide tartarate	1 : 25,000	+
4-phenyl-thiosemicarbazide	1 : 25,000	+
N-N diphenyl »N« aminoguanidine	1 : 50,000	+
2-6 dimethyl 1-5 phenanthrolin	1 : 25,000	+
N′ phenyldiguanidino chlorhydrate	1 : 25,000	+

TABLE II

The effect of enzyme-poisons, pharmaceutical products and antibiotics on penicillinase

Name of substance	Concentration tested	Effect on	
		endoenzyme	exoenzyme
a) Potassium cyanide	1 : 5,000	∅	∅
Sodium fluoride	1 : 2,500	∅	∅
Sodium azide	1 : 5,000	∅	∅
Formaldehyde	1 : 10,000	∅	∅
b) Quinine HCl	1 : 1,000	+	+
Mapharsen	1 : 10,000	+	+
Xylocaine HCl	1 : 10—20,000	+	+
c) Threomycin /chloramphenicol/	10—20 γ/ml	∅	∅
Streptomycin	20—50 γ/ml	∅	∅
Ultraseptyl	1—10 mg/ml	∅	∅

Nevertheless, the observations made in connection with the above substances have confirmed the fact that the enzyme is sensitive to reduction.

In group 2 newly synthetized quaternary ammonium compounds were examined for their effect on the enzyme. Of the compounds examined, none proved to possess such an effect. With some quaternary salts the concentration found effective was due to a general cell-poisoning effect.

Under point *a)* in Table II is shown the effect on penicillinase of poisons active against other enzymes. In accordance with data in the literature, in the

concentrations given, potassium cyanide, NaF, etc. were all ineffective on penicillinase.

Under point *b)* in Table II is shown the effect on penicillinase of other substances. These included in the first place pharmaceutical products, morphine derivatives, coffeine, camphor, as well as quinine salts and arsenic. Of these, only quinine and arsenic were effective, as it had been pointed out by *Issekutz* at al. [7] several years ago. Quinine does, however, not act electively on penicillinase, its action being rather of the general enzyme-blocking type. In Thunberg experiments quinine also inhibited the dehydrogenase system of the bacterium at the concentration it blocked penicillinase.

It is well-known that combined antibiotic therapy may often prove effective against otherwise resistant bacteria. Antibiotics and chemotherapeutics were therefore examined for their action on the enzyme produced by the resistant bacterium. It is namely known that a bacterium producing penicillinase will, on passage *in vitro* and after developing resistance to another antibiotic (e. g. aureomycin), lose some of its enzymic activity and will, consequently, become more susceptible to penicillin [8]. The results of these experiments are shown under point *c)* of Table II. It can be seen that at the concentrations examined chloramphenicol (threomycin), streptomycin, or ultraseptyl (sulphamethylthiazole), were ineffective. Thus, the favourable effect of a combined application is not to be ascribed to penicillinase inhibition but to interference at some other point of bacterial metabolism by the associate antibiotic or chemotherapeutic agent.

A condition of the effectiveness of penicillin against a resistant organism is that the antibiotic should be present in the proximity of the organism at a sufficiently high concentration for an adequate period of time. It appeared therefore reasonable to examine the rate at which different penicillin preparations are broken down by the enzyme. In the first part of these experiments newly synthetized pantocaine, nupercaine, xylocaine, atebrine and quinine salts of penicillin were examined and their respective breakdown rates were compared to that of the sodium salt of penicillin G. Xylocaine-penicillinate was found to be broken down at the slowest rate.

Next, xylocaine-penicillinate and xylocaine itself were examined for their action on penicillinase. The effect of xylocaine on staphylococcus penicillinase is shown in Fig. 1. It can be seen that 60 U/ml (38 micrograms) of penicillin (mark 1) were completely broken down by the enzyme (mark 2). At the same time the same amount of enzyme, in the presence of 1 : 20,000 xylocaine, broke down only a certain proportion of the penicillin present (mark 3). Xylocaine by itself does not inhibit staphylococcal growth (mark 4). Xylocaine-penicillinate was broken down at a slower rate than penicillin sodium (mark 5) and this could be further delayed by the addition of 1 : 20,000 xylocaine hydrochloride (mark 6). Thus it seems probable that liberation of xylocaine from the molecule accounts

for the slower breakdown rate of xylocaine-penicillin. The inhibitory effect is proportional to the concentration of xylocaine.

In further studies attempts were made to obtain information about the mechanism of inhibition and to conduct studies *in vivo* on penicillinase produc-

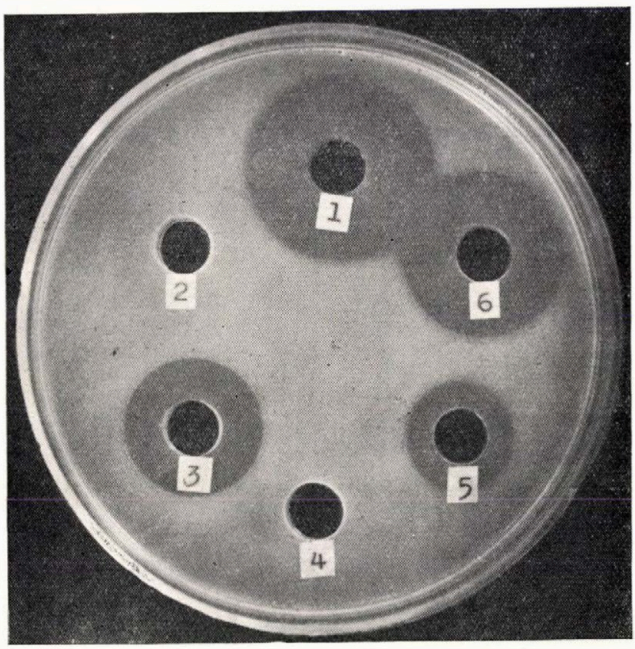


Fig. 1

Mark 1.: 60 U/ml (38 gamma) penicillin sodium
Mark 2.: the same plus 0,1 ml penicillinase
Mark 3.: the same as at mark 2 plus 1 : 20,000 xylocaine hydrochloride
Mark 4.: 1 : 20,000 xylocaine hydrochloride
Mark 5.: Xylocaine penicillinate equivalent with 60 U/ml penicillin plus 0,1 ml penicillinase
Mark 6.: the same as at mark 5 plus 1 : 20,000 xylocaine hydrochloride
Systems 1—6 were incubated in a total volume of 1,2 ml at 37°C for 45 minutes

ing staphylococci instead of the enzyme preparations. The studies *in vivo* reflect natural conditions more reliably than the *in vitro* ones. Several strains of *Staphylococcus aureus* with different resistance to penicillin were tested for rate of growth in media containing sodium penicillinate or xylocaine penicillinate (containing the same amount of penicillin). To the latter medium also xylocaine HCl was added at a ratio of 1 : 6,000. The rate of growth was determined by nephelometry, in ½ hour intervals. Thus, in the former experiments the amount of penicillin, and in the latter studies the rate of bacterial growth was measured.

The curves in Fig. 2 show the growth of a strain of *Staphylococcus aureus* resistant to 200 U/ml penicillin. This bacterium was grown in broth to which various penicillin salts and /or xylocaine were added. The curve for growth in penicillin sodium broth is protracted, as compared to the growth curve for the medium containing xylocaine only. There is a prolonged lag phase in the

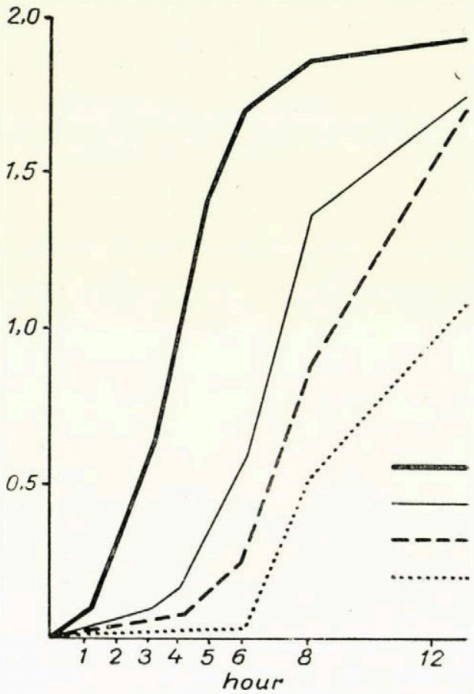


Fig. 2. Growth curves for an *in vivo* resistant strain of Staphylococcus pyogenes (200 U/ml) in broths containing different penicillin salts and xylocaine

——— : Control
——— : Na-Pen. 200 U/ml
— — — : Xyl.-Pen. 200 U/ml
. . . . . : Na-Pen. 200 U/ml. + 1 : 6,000 Xyl.

growth curve for the medium containing penicillin sodium. Even flatter and more prolonged is the growth curve for the xylocaine-penicillinate broth (in which the amount of penicillin per ml was identical with that in former medium) and the addition of 1 : 6,000 xylocaine hydrochloride to the medium resulted in a further prolongation of the lag phase. On the basis of penicillin estimations it could be established that *the delay in multiplication was caused by free penicillin present in the medium. The strain began to grow only after penicillin had disappeared from the medium, i. e. after it had been broken down completely by the penicillinase produced by the bacterium.* The lag in growth is thus ascribable to enzyme

inhibition and, consequently, to a prolonged presence of penicillin in effective concentration.

In further experiments it was endeavoured to determine the concentration of xylocaine capable of inhibiting the growth of strains showing different degrees of resistance to penicillin, in a penicillin concentration as low as 1 U per ml. Strains of *Staphylococcus pyogenes*, whose resistance to penicillin sodium varied between 500 U/ml and 5 U/ml of sodium penicillin, were examined for growth in broths containing different amounts of xylocaine penicillinate. To these broths xylocaine HCl was added in concentrations increasing from 1 : 20,000 to 1 : 1,000 and the concentration of penicillin was simultaneously reduced. The volume of each broth medium was 5 ml, and the inocula were 0,05 ml in volume, originating from 24-hour broth cultures. The results are shown in Table III.

TABLE III

Multiplication of strains (+) showing different resistance, in the presence of different concentrations of xylocaine penicillinate and xylocaine HCl

Composition of medium		Penicillin resistance of strain, in penicillin units per ml								
Units of penicillin per ml	Xylocaine concentration	500	100	20	10	10	10	5	5	5
2,5	1 : 1,000	+	−	−	−	−	−	−	−	−
1,25	1 : 1,000	+	−	−	−	−	−	−	−	−
0,6	1 : 1,000	+	+	±	+	+	+	−	−	+
5,0	−	+	+	+	+	+	+	−	−	+
−	1 : 1,000	+	+	+	+	+	+	+	+	+

It may be seen in Table III that in the media containing 2,5 U or 1,25 U of penicillin, none of the strains began to grow in the presence of 0,1 per cent xylocaine, except the strain resistant to 500 U/ml of penicillin. If the xylocaine concentration was sufficiently high, 1,25 U/ml of penicillin was also capable of inhibiting the growth of the strain resistant to 100 U/ml of penicillin. Strains of a lower resistance behaved similarly. As seen in the last line of Table III, 1 : 1,000 xylocaine did not inhibit bacterial growth at all. However, its presence in the medium inhibited the activity of the introduced enzyme to such an extent that it was not capable of destroying penicillin present in a concentration as low as 1,25 U/ml. Thus, penicillin remains in the medium for prolonged periods of time and inhibits bacterial growth.

In an attempt to explain the effect, the following examinations were made 1. The effect of xylocaine on isolated endocellular and exocellular enzyme preparations were studied in a phosphate buffer medium, at different pH values

and 2. the growth of resistant strains was estimated at different concentrations of xylocaine or of penicillin in a strongly buffered medium, at different pH values. The results may be summarized in that xylocaine in a phosphate-buffered medium inhibits the isolated enzyme in a lower degree. The acidity of the medium may thus play some role in the intensity of the effect.

The growth curves indicate that the effect of xylocaine is the strongest where the medium provides for the most rapid growth of bacteria. In experiments using well-buffered media exhibiting different pH values the most marked

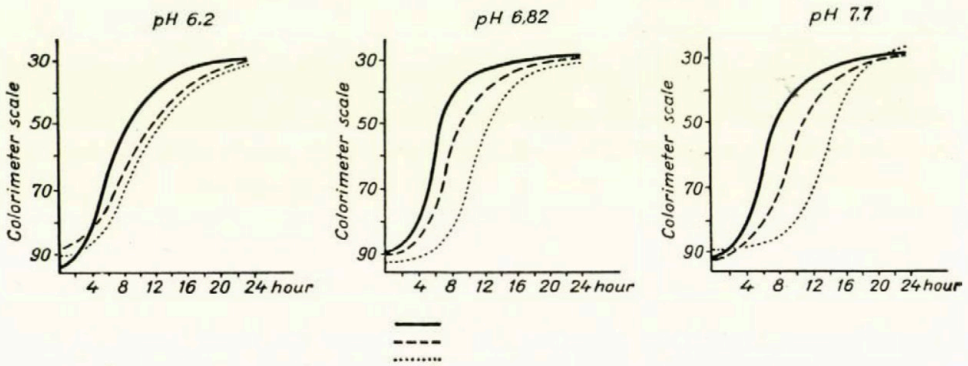


Fig. 3. Shape of growth curves for different pHs

———: Control
— — —: Na-Pen. 100 U/ml
. . . . . : Na-Pen. 100 U/ml + 1 : 5,000 Xyl.

xylocaine-inhibitory action was found in the range of from pH 6,82 to pH 7,7. No xylocaine effect could be demonstrated at pH 6,2 or less. This is understandable, as with such a reaction the acidity itself inhibits the activity of penicillinase. At pH 7 the strain resistant to 200 U/ml grew in a medium containing 50 U/ml of penicillin and a 1 : 5,000 concentration of xylocaine, at a considerably delayed rate, as a consequence of a retarded breakdown of penicillin.

The same conditions were maintained in tests with procaine or monocaine. No inhibitory effect of any kind could be noted, i. e. the growth curves were not different from the original curve.

Examination of the role played by the amount of the inoculum has revealed that at the same xylocaine and penicillin concentrations the effect of xylocaine depended on the amount of enzyme introduced (i. e. on the number of living bacteria). If the inoculum is small, the growth curve becomes flat. On increasing the amount of the inoculum, the effect diminishes gradually and when a large quantity is inoculated, xylocaine fails to inhibit. It is obvious that in such a case the amount of enzyme introduced is so high as to make xylocaine in the concentration present incapable of blocking it.

TABLE IV

Different, on penicillinase ineffective substituted N-diethylglycil-anilide-hydrochlorides
Position and quality of substituents on the benzol ring in compounds No. 1 to No. 21.

1. —	11. 2,4-dichlor
2. 2-methyl	12. 2,5-dichlor
3. 2-ethyl	13. 2,6-dichlor
4. 3-chlor	14. 3,5-dichlor
5. 4-methyl	15. 2,6-dibrom
6. 4-chlor	16. 2-methyl-4,6-dichlor
7. 4-bromine	17. 2,6-dibrom-4-methyl
8. 2-bromine-4-methyl	18. 2-methyl-4,6-dibrom
9. 2-methyl-4-chlor	19. 2,4,6-tribrom
10. 2-methyl-4-bromine	20. 2-nitro-4,6-dichlor

21. 2,6-dichlor-4-amino

In Table IV are shown the effects of different substituted N-diethylglycil-anilide-hydrochlorides on penicillinase.* None of the compounds examined

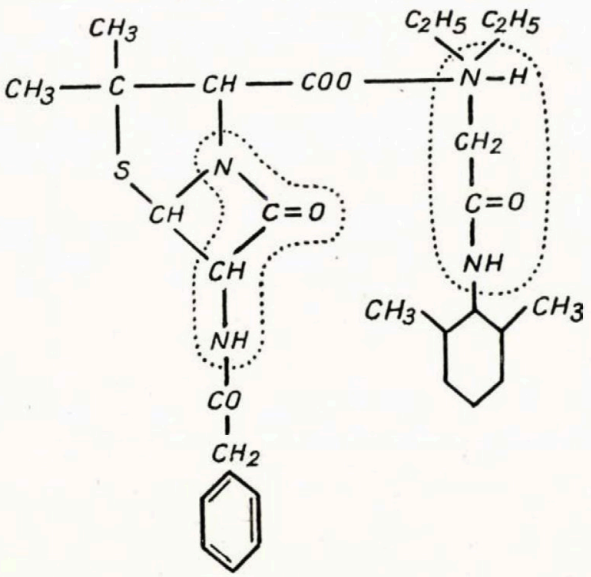


Fig. 4. Xylocaine penicillinate

was effective in such a high concentration as 1 : 2,000. This seems to indicate that *if the methyl group of the benzol nucleus is substituted by other groups, the effect ceases*, and that it is the dimethyl group in the benzolring of the xylocaine molecule which must be held responsible for the effect. Another evidence supporting this view is the ineffectiveness of procaine and of monocaine. On the basis of this assumption it seems probable that the underlying principle of the mecha-

* The compounds were received through the courtesy of Dr. D. Beke of the Institute of Organic Chemistry, University of Technical Sciences, Budapest, for which we express our thanks.

nism is in some way correlated with a part-identity of the xylocaine and penicillin molecules.

A supposed similarity in the position occupied in the space by the dimethyl group of penicillin and by that in xylocaine (although the latter is linked to the aromatic ring in another form), and also the marked similarity between certain parts of the xylocaine and penicillin molecules, may explain for their competitive antagonistic behaviour against the enzyme. It may be that penicillinase is bound to the penicillin molecule through the methyl group, and xylocaine, by means of its methyl groups may also bind some of the enzyme. In this way xylocaine may, temporarily at least, protect part of the penicillin against enzymatic breakdown.

In connection with the experiments reported another question may emerge. Are the penicillinases produced by different bacteria identical? or is there a difference between endocellular and exocellular penicillinases? The experiments have shown that the inhibitory substances blocked both types of enzymes in an equal measure. It seems therefore likely that they do not differ substantially in their active groups. The difference might very well lie in their transporting proteins, but even this is of no particular importance, since it has been reported [9] that an anti-penicillinase inhibiting one kind of penicillinase produced by a particular bacterium species may also block the penicillinase produced by another bacterium.

SUMMARY

1. Different exocellular penicillinases, as well as the enzymic systems of *in vivo* resistant Staphylococcus aureus strains were examined for inhibition by a variety of substances. The enzyme was found to be sensitive to reducing agents.

2. The common enzyme-blocking agents were found ineffective against penicillinase.

3. At concentrations effective against other enzymes, arsenic and quinine compounds were found to be effective against penicillinase.

4. Antibiotics and chemotherapeutics were found ineffective against the enzyme. Their favourable effect in combined application is thus attributed to some other mechanism.

5. The different salts of penicillin differ in the velocity of their enzymatic breakdown, that of xylocaine-penicillinate being the slowest.

6. In a concentration of 1 : 20,000, xylocaine blocks the enzyme, prolongs the resting phase of resistant bacteria and at a concentration of 0,1 per cent it inhibits bacterial growth, even in the presence of 1 U/ml of penicillin.

7. The effect is proportional to the amount of enzyme introduced, and for the effect the dimethyl group in the benzol ring of the xylocaine molecule is held responsible.

8. Xylocaine analogons, in which the dimethyl groups have been substituted with other groups, are ineffective against the enzyme.

9. It may be assumed that, due to a certain part identity existing between xylocaine and penicillin, these two agents are in a competitive antagonism against penicillinase.

LITERATURE

1. *Abraham, E. P., Chain, E.:* Nature 837 (1940).
2. *Woodruff, H. B., Foster, I. W.:* J. Bact. **7,** 49 (1945).
3. *Henry, R. J., Housewright, R. D.:* J. Biol. Chem. **167,** 559 (1947).
4. *Dietz, C. C., Bondi, A. Jr.:* J. Bact. **55,** 849 (1948).

5. *Gilson, B. St. C., Parker, R. F.:* J. Bact. **55,** 801 (1948).
6. *Housewright, R. D., Henry, R. J.:* J. Biol. Chem. **167,** 553 (1947).
7. *Issekutz, B.* et *al.:* A Lecture.
8. *Barber, M.:* J. Gen. Microbiol. **8,** 104 (1953).
9. *Abraham, E. P.* cit. *Sumner, J. B.* and *Myrbäck, K.:* The enzymes. Acad. Press, New York, 1951 p. 1170.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПЕНИЦИЛЛИНАЗЫ

Л. Ваци и *Й. Ури*

Резюме

1. Авторы проводили эксперименты по торможению различными веществами функций различных вне- и внутриклеточных пенициллиназ и энзимов резистентных in vivo штаммов Staphylococcus aureus. Установили, что энзим чувствителен к редуцирующим веществам.

2. Обычные угнетатели энзимов не эффективны по отношению к пенициллиназе.

3. Соединения хинина и мышьяка угнетают пенициллиназу в концентрациях эффективных по отношению к прочим энзимам.

4. Энзим не поддается действию антибиотиков и химиотерапевтических веществ, следовательно, их благоприятное действие, выявляющееся в комбинированной антибиотической терапии, создается другим механизмом.

5. Энзиматическое расщепление разных солей пенициллина является различным. Наиболее медленно расщепляется ксилокаин пенициллината.

6. Ксилокаин угнетает энзим в концентрации 1 : 20.000, увеличивает продолжительность ляг-фазы размножения резистентных бактерий, в концентрации $1^0/_{00}$ тормозит размножение бактерий даже при концентрации пенициллина 1 E/ml.

7. Действие пропорционально количеству введенного энзима зависит и от диметиловой группы, находящейся в бензольном кольце молекулы ксилокаина.

8. Аналоги ксилокаина, в которых диметиловые группы замещены другими группами, не эффективны по отношению к энзиму.

9. Возможно предполагать, что между молекулами ксилокаина и пенициллина — вследствие тождественности некоторых частиц молекул — существует компететивный антагонизм по отношению к пенициллиназе.

THE ROLE OF A BLASTOMYCES IN THE AETIOLOGY OF INTERSTITIAL PLASMOCYTIC PNEUMONIA OF THE PREMATURE INFANT

By

A. CSILLAG and L. BRANDSTEIN

State Institute for Public Health and László Hospital, Budapest

(Received April 23, 1954)

Introduction

During recent years an increasing number of papers have been published on interstitial plasmocytic pneumonia of the premature infant. Especially in Central Europe are there many authors concerned with the problem, owing to the singularly high incidence of the disease in that area. In his review on infantile pneumonia, *Surányi* [1] emphasized the growing importance of the problem in Hungary. Since 1952, also Hungarian periodicals contain numerous studies on infantile interstitial pneumonia (2—17) and the scope of research has been widely extended, particularly in the field of therapy.

Of the numerous theories on the aetiological agent involved, the protozoal theory has gained the most general acceptance. *Jirovec* et al. [18] are credited with the significant discovery that in the lung of premature infants dying with interstitial pneumonia a round, octonuclear, less frequently quadrinuclear, bi- or mononuclear »characteristic structure« can be detected, which they thought to be the causative agent and identical with the sporogonium of the protozoon *Pneumocystis carinii* [19].

Opposing the view of *Jirovec* are *Büschner* et al. [20], as well as *Giese* [21]. *Giese* is of the opinion that the »characteristic structure« is not the sporogonium of a protozoon, but the ascus of a fungus. He succeeded on several occasions in recovering a blastomyces from necropsy material, but he has not described the morphological or biochemical properties of that fungus, nor did he substantiate his view by experimental evidence: he has produced no »characteristic structure« *in vitro*, and he did not induce the disease in experimental animals. This, obviously, is the explanation for the lack of interest detectable in the literature in relation of his observation.

In August, 1953 we began experiments aimed at elucidating the potential role of a fungus in the aetiology of the disease under discussion. In two lectures and in two preliminary reports [11, 13, 14, 16] we have given brief accounts of the actual state of our work, reporting that we could recover from the lungs of

premature infants dead of interstitial pneumonia the same species of blastomyces on several occasions ; we have approximately identified the fungus ; we have produced the »characteristic structure« described by *Jirovec* and could identify it as being the ascus of the fungus ; by means of making experimental animals aspirate a suspension of the fungus we have successfully induced in these animals a pathological condition closely resembling human interstitia pneumonia. Microphotographic evidence has been presented of the asci of the fungus and of the histological appearance of the lungs of experimental animals in which the disease had been induced.

One month after we had published our report [11] *Simon* [22] reported on essentially similar findings seemingly confirming most of our earlier experimental results.

Material and Methods

Culture media. An elective fungus medium [23] was inoculated with material from the lungs of dead premature infants. For further cultivation, *Sabouraud*'s agar [24] and malt agar [25] were employed. For identification purposes the following media were used : liquid malt extract [25], corn-meal agar [24], gelatine medium [26], a solid medium for studying esterification and formation of starch-like groups [25], a solid medium for auxanographic examination of N consumption and a liquid medium for the same purpose [25], *Gorodkova*'s agar [27], an alcoholic nutrient solution [25], a solid medium for auxanographic examination of sugar assimilation and a liquid medium suitable for the same purpose [25].

Experimental animals. Light brown mice from the stock of the State Institute for Public Health and adult grey rabbits were used.

Strains of fungus used in control experiments were *Saccharomyces cerevisiae*, *OMIKI* strain and *Candida albicans*, *OKI* strain.

Identification of fungus occurred by the method of *Lodder* and *Kreger Van Rij* [25], except for the determination of fermentative action, which was performed by the method of *Vas* [28], and micro-cultivation of fungus, which was made by a modified version of *Henrici*'s method [29].

Staining. The fungus was stained *in vivo* with a 1 per cent solution of neutral red. Asci were stained according to *Giemsa*, contrast staining of asci was made by *Maneval's* method [30].

Isolation of fungus from lung material. Necropsy material was finely ground and samples were taken from various areas for inoculation into 15 to 20 test tubes containing the elective fungus medium. The samples were inoculated by means of a loop. Incubation occurred at 26°C for periods of 4 to 8 days.

The fungus was then passaged on malt agar slopes and *Sabouraud's* agar, at 26°C, incubating for 48 hours.

Infection of mice. The fungus was grown for 72 hours on malt agar, then washed off with physiologic saline. The dense suspension so obtained was used as inoculum. One or two drops of the suspension were placed on the nostrils of the mouse and kept there until the animal aspirated them. The first inoculation was made when the mice were less than 24 hours old, with subsequent inoculations following every day until the animals succumbed or were killed. The animals were kept together with their mothers at room temperature. They were weaned on the 14th day.

Infection of rabbits. Rabbits were given 0,5 ml of the above described fungus suspension through a tracheotomy canulla on each day for 3 days.

Isolation of fungus

Attempts at isolating the fungus were made from the lungs of five premature infants dead with interstitial pneumonia. The diagnosis was based on clinical

symptoms and X-ray evidence. In smears prepared from abraded lung material taken at autopsy, the structures described by *Jirovec*, as well as forms resembling blastomyces were visible. In 4 out of the total of 5 cases we were successful in isolating the fungus.

In addition to the fungus under discussion, also *Candida albicans* (thrush) was recovered. This species is commonly encountered in cultures made of lung tissue from subjects who died with any kind of pulmonary disease.

The fungus in question could be isolated in three cases from the sputum of premature infants diagnosed to be suffering from interstitial pneumonia on the basis of clinical symptoms.

In premature wards media were exposed in Petri dishes. The fungus could be recovered in this way, too, indicating that in the warm, humid air of the wards it is present in large quantities.

In the above cases the fungus was grown on an elective fungus medium, in which saprophyte bacterial contaminants mostly do not grow. In this way pure cultures of the fungus were obtained in almost every case.

By repeated purification and spreading, single cell cultures could be prepared from the fungus colonies and it was established that all cultures displayed identical morphological and biochemical properties.

By the same method the lungs of 30 premature infants dead of other diseases were examined for presence of the fungus, without any success.

Attempts at isolating the fungus from the vaginal discharge of 15 pregnant and 15 non-pregnant women, were also negative. In these cases either *Candida albicans*, or no fungus at all could be recovered.

The fungus in question could not be isolated from pharyngeal swabs taken from premature infants suffering from diseases other than interstitial pneumonia.

Morphological and biochemical properties of the fungus

1. The microscopic appearance of a culture of fungus grown in liquid malt extract for 48 hours at 26°C is as follows. Spherical, multipolarly budding blastospores, 3,5 to 5 microns in size are seen, but neither hyphae, nor pseudomycelia are visible. Characteristic is the packed distribution of fungi. In the first few subcultures the cells varied between 5 and 6 microns in size, i. e. during growth a marked degeneration takes place. The fungus does not form either a ring, or a membrane on the surface of the culture in 30 days. The shape and size of blastospores are similar to those of the blastospores occurring to-

gether with asci in the lungs of premature infants dead of interstitial pneumonia.

2. In corn meal agar, under semi-anaerobic conditions at room temperature, only spherical groups of cells were formed during the 10 days of observation ; hyphae or chlamidospores were absent.

3. In micro-cultures in malt-agar the picture was the same.

4. The same is valid for micro-cultures on corn meal agar incubated at 26°C for 30 days.

5. In seeded gelatine no mycelium-formation occurred during the 10 days of incubation at room temperature.

6. The fungus does not form either esters or starch-like groups.

7. Auxanography as well as testing in liquid medium revealed that the fungus assimilated $(NH_4)_2SO_4$, but not KNO_3.

8. The following sugars were assimilated: dextrose, galactose, saccharose, maltose, raffinose. Lactose assimilation could not be observed.

9. On *Adams'* medium, as well as on *Gorodkova's* agar some of the cells form asci containing a single ascospore. In one case we succeeded in isolating from a fresh culture made directly from lung tissue, also *in vitro*, an ascus containing 8 ascospores. *Octospore forms are, however, regularly found only in the lung of the experimental animal. For the formation of asci containing 8 ascospores conditions prevailing in the living organism are required.* Asci formed in the lung of the experimental animal are smaller than those detectable in infant's lung. This may be in part due to degeneration ascribable to saprophyte conditions, and in part to the shorter life span of the experimental animal as compared to that of man.

10. The fungus does not utilise alcohol, as sole source of carbon.

11. Some difference in fermentative action may be detected between the single strains of the fungus. Each one of the fermented dextrose, saccharose and maltose with alcohol and gas formation ; two strains were found to ferment galactose and raffinose, too. None of our strains fermented lactose. *The fermentative capacity of the subcultures decreases during cultivation.*

12. Appearance of a 25-day giant culture on malt agar, or *Sabouraud's* agar, with incubation at room temperature was as follows. The diameter of the colony amounts to 13 mm, it is white, somewhat convex and concentrical rings are visible on it. Its consistency is smearable, it has a greasy appearance and a smell strongly reminiscent of that of yeast. Under the microscope multipolarly budding spherical cells, but no hyphae are seen.

On the basis of the *Lodder* and *Kreger van Rij* identification key the fungus may be best listed into the group of *Endomycetales*. According to the above described properties, it belongs to *Saccharomyces*, but a reliable and accurate classification will be possible only on the basis of careful genetical studies.

Animal experiments

Attempts were made with the fungus to infect laboratory animals.

In the first experiments ten adult rabbits were used. Infection was carried out by the above described method. Of the ten rabbits, five were infected and five served as controls. The latter were given, by the same method, physiological saline solution.

The infected animals exhibited the first X-ray shadows on the 6th day. X-rays were then taken at 4-day intervals and the shadows were found to be increasing in extent. X-rays taken from the controls were and remained negative. On the 23rd day of the experiment the animals were killed by stunning.

At necropsy extensive focal pneumonia and emphysema were found. In smears prepared from the lungs a large number of budding forms were found, but at that time no »characteristic structures« — i. e. asci — were detectable. As it was found out later the asci become phagocyted during such a long experimental period, and that explains their disappearance. Histological sections made from areas with pneumonia exhibited a pattern similar to that seen in infantile interstitial pneumonia : the interstitium was markedly widened and infiltrated by plasma cells, lymphocytes and giant cells. The »foamy substance« said to be characteristic of the histological appearance has, however, not been found. Except for these differences, the histological pictures were identical. Pure cultures of the fungus could be recovered from the lungs of infected rabbits.

The disease in man being characteristic of the premature age, in further experiments newborn mice were used. These animals were infected as described above.

Group 1 contained 7 mice. These were made to aspirate only a suspension of the fungus. They showed retarded growth, with the average weight being 10 g at the age of 3 weeks, as compared to the 13 g of the controls. Four animals died within 5 to 28 days. The two survivors were killed by stunning on the 28th experimental day. At necropsy pneumonia was found in every case. The histological pattern closely resembled that seen in infantile insterstitial pneumonia. The interstitium was markedly widened, the alveoli were filled with foamy substance. Material taken from the cut surface of the lung and stained according to Giemsa revealed vegetative forms of the blastomyces and asci. From some lungs pure cultures of the fungus could be grown. Animals not dying spontaneously exhibited signs indicative of healing. Blastospores and asci were found only in the phagocyted state (Table I).

The second mouse experiment was performed on 12 animals. These were induced to aspirate a fungus suspension and, in addition, were given daily 4000 U of penicillin subcutaneously. This was made because, on the one hand, in the therapy of the human disease penicillin is commonly used, and, on the other

TABLE I

Interstitial pneumonia induced by aspiration of fungus suspension

No. of mice	Age at necropsy days	Mode of death	Gross pathology	Histology	Lung smear from cut surface	Growth in culture
1.	5	Spontaneous	Pulmonary hyperaemia	Not examined	A few blastospores	+
2.	11	Spontaneous	Pulmonary emphysema, foci of pneumonia	Similar to i. p.* asci in alveoli	Many blastospores	+
3.	16	Spontaneous	Emphysema, apical pneumonia	Similar to i. p., asci in alveoli	Blastospores and asci	+
4.	27	During treatment	Emphysema, areas of pneumonia	Similar to i. p.	Blastospores and asci	+
5.	28	Spontaneous	Emphysema, apical pneumonia	Similar to i. p.	Blastopores, many asci	+
6.	28	Stunning	Haemorrhagic, emphysematous lungs, pneumonia	Widening of interstitium still visible, otherwise healing	Phagocyted fungi and asci	+
7.	28	Stunning	Haemorrhagic, emphysematous lungs, pneumonia	Widening of interstitium still visible, otherwise healing	Phagocyted fungi and asci	+

* i. p. = interstitial pneumonia

hand, it is a well-known fact that prolonged administration of antibiotics creates favourable conditions for the development of mycoses by suppressing the antagonistic flora, or, presumably, also by direct stimulation. In this group clinical symptoms were more grave than in group 1 (Table II). The mean weight of the infected animals remained below 8 g at the age of three weeks, as compared to the 13 g of the controls. Fifty per cent of the animals succumbed, the rest were killed. Pathological, histological examinations, the appearance of material taken from the cut surface of the lung and recovery of fungus yielded similar results as those described for group 1. In addition to vegetative forms, and to asci containing 8 ascospores, also asci containing 1, 2 or 4 ascospores, as well as such ascospores as were released from ruptured asci were found. The latter ascospores were called »free parasites« by *Jirovec.* (*v.* photographs).

TABLE II

Interstitial pneumonia induced experimentally by aspiration of fungus suspension and by daily 4000 U penicillin subcutaneously

No. of animal	Age at necropsy, days	Mode of death	Gross examination	Histology	Lung smear from cut surface	Growth in culture
1	10	Stunning	Negative	Negative	Few blastospores	—
2	14	Spontaneous	Pulmonary emphysema, foci of pneumonia	Not examined	Blastospores, few asci	+
3	15	Stunning	Pulmonary emphysema, foci of pneumonia	Similar to i. p.* many fungi in alveoli	Blastospores, few asci	+
4	15	Spontaneous	Pulmonary emphysema, foci of pneumonia	Similar to i. p. many fungi in alveoli	Blastospores, few asci	+
5	15	During treatment	Pulmonary emphysema, foci of pneumonia	Similar to i. p. many fungi in alveoli	Blastospores, few asci	+
6	17	Stunning	Bilateral pneumonia	Similar to i. p.	Blastospores, few asci	+
7	17	Stunning	Bilateral pneumonia	Similar to i. p.	Blastospores, asci	+
8	24	Spontaneous	Pale red lungs, gray spots	Interstitium markedly infiltrated, alveoli compressed, in them many asci	Blastospores, asci	—
9	26	Spontaneous	Emphysema, pneumonia	Similar to i. p.	Blastospores, asci	+
10	28	Spontaneous	Emphysema, pneumonia	Similar to i. p.	Blastospores, asci	+
11	28	Stunning	Emphysema, pneumonia	Widening of interstitium still visible, otherwise healing	Blastospores, asci	+
12	28	Stunning	Bilateral superior lobe pneumonia	Widening of interstitium still visible, otherwise healing	Phagocyted fungi and asci	+

* i. p. = interstitial pneumonia

Control animal experiments

Subsequently it seemed of interest to elucidate the following questions.

(I) Does aspiration of killed fungi not cause changes similar to interstitial pneumonia?

(II) Has penicillin alone (in the doses given) no harmful effect, particularly on baby mice?

(III) Since *Simon*, in his study cited [22], identified the fungus he had isolated and thought to cause intersititial pneumonia as *Candida albicans*, the question was justified whether, symptoms resembling closely those of interstitial pneumonia are not caused also by *Candida albicans*?

(IV) It is known that some mycoses may be caused by different, closely related fungi. In the light of this evidence it had to be clarified whether some other fungus or fungi belonging to *Saccharomycetales* and related to the fungus we had isolated could not cause a similar pathological condition.

In an effort to answer the above questions, the following experiments were undertaken.

(I) Five mice were made — by the above method — to aspirate a fungus suspension previously exposed to boiling for 30 minutes in an autoclave. The sterility of the suspension was checked by culturing. During the 28 days of observation the animals exhibited no signs indicative of pathological changes. At the end of that period they were killed. No pathological changes, anatomical or histological, could be detected. No fungus could be recovered from the lungs, nor were there blastospores or asci smears made from the lungs.

(II) Five newborn mice were administered over a period of 28 days, penicillin subcutaneously, in the dosage described for the mice in group 2. The mice proved to be negative from every respect.

(III) A well-defined culture of *Candida albicans* was given to aspirate by the described method to newborn mice. The culture used was grown in malt agar at 37°C for 48 hours and contained only blastospores, but no hyphae or pseudomycelia. All mice developed grave clinical symptoms and succumbed within 9 days. According to pathological, histological and mycological evidence, the animals had died of the well-known »Soor-mycosis«. This condition does not resemble human interstitial pneumonia at all, nor is it similar to the condition we could induce in our experimental animals. Smears made from material taken from the cut surface of the lung contained blastospores, hyphae and mycelia, but no structures similar to asci. The fungus could be recovered from the lungs in pure culture.

(IV) In another group of 8 mice the animals were made to aspirate a suspension of *Saccharomyces cerevisiae*, which is closely related to the fungus we had isolated. None of these animals developed clinical symptoms and none succumbed, although the suspension they were made to aspire was prepared the same

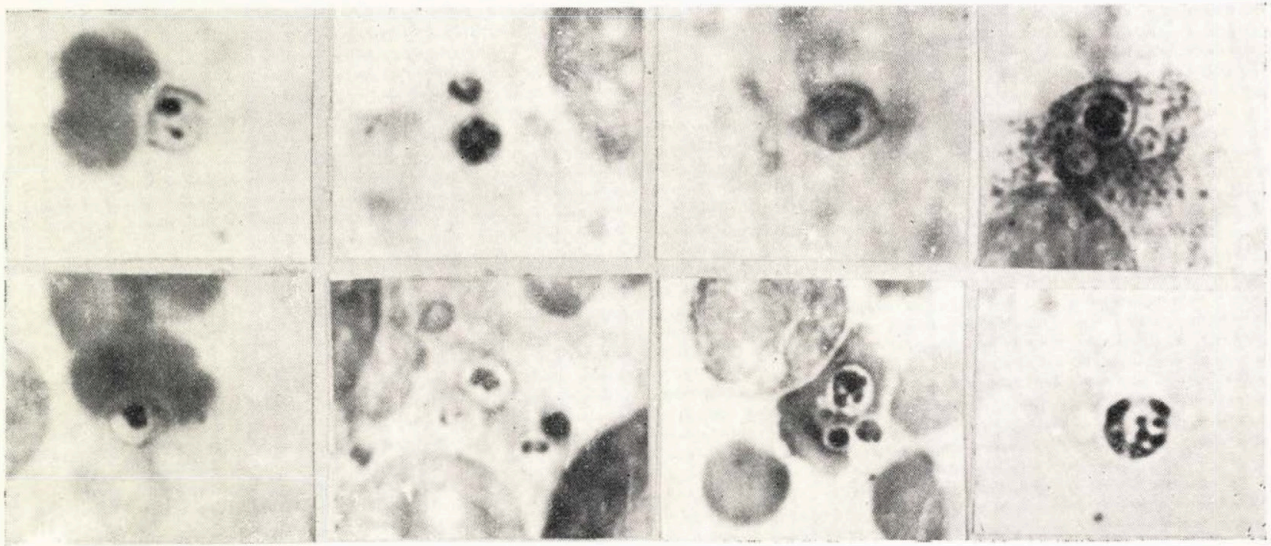


Fig. 1. The photographs show lung smears made from a mouse in which the disease had been induced experimentally-Original size of asci: 4 to 7 microns.
Development of asci: mono-, bi-, quadri- and octo-spored forms. In the last photograph beside the ascus a mass of ascospores from a disrupted ascus is visible: these are termed »free parasites« by *Jirovec*

way as the other suspension of the fungus we had isolated, and contained a comparable amount of fungi. The animals were killed by stunning 18 to 28 days following inoculation. Necropsy revealed no gross pathological changes. In histological sections a few foci of pneumonia could be detected ; these, however, did not resemble the changes seen in human interstitial pneumonia. In smears from the lungs a few blastospores, but no asci could be seen.

Discussion

The experiments were aimed at elucidating two problems,

(I) is the »characteristic structure« described by *Jirovec* the sporogonium of a protozoon, or is it the ascus of a blastomyces?

(II) is this microorganism the pathogenic agent, or is it only a concomitant infection? Is it capable of inducing experimentally or otherwise interstitial pneumonia and is in the animals so infected the »characteristic structure« demonstrable?

The first question, as it has been mentioned in the introduction, has been put forward by several authors. Some of them, so, for instance *Zoltai* [31] in Hungary, refused to accept that the »characteristic structure« is identical with the sporogonium of a protozoon. Zoltai has pointed out that the structure did not resemble a protozoon and that the epidemiological features of the disease are in contradiction with protozoal aetiology.

We have succeeded in experimentally producing in the mouse lung asci morphologically similar to the »characteristic structure«. Thus, in our opinion, we have proved that the characteristic structure described by *Jirovec* is not a protozoon, but the ascus of the fungus we had isolated.

The second question could not be answered satisfactorily, not even on the basis of the repeatedly successful isolation of the fungus from the lungs of premature infants dead of interstitial pneumonia, since it is well known that from necroscopy material a great variety of fungi may be recovered. It is, however, thought to be significant that by aspiration of the fungus a pathological condition closely resembling human interstitial pneumonia could experimentally be induced in animals and that in the lungs of such animals the »characteristic structure« was also present. In this way we have confirmed by experimental methods the ingenious, but experimentally not substantiated, theory of *Büschner* et al., and of *Giese*.

The pathogenicity of the fungus became somewhat diminished during growth in culture media.

It has been mentioned that *Simon* identified the pathogenic fungus as *Candida albicans*. It is thought that this identification was erroneous, as we

established experimentally that *Candida albicans* caused in newborn mice a common thrush mycosis, but no interstitial pneumonia.

We believe that we have succeeded in proving that our fungus is capable of inducing interstitial pneumonia and that it is involved in that disease of the premature infant. It remains to be determined to what extent the fungus can be held responsible for the disease and what roles are played by other factors. We fully agree with, and attribute significance to a statement by *Surányi* [12] that »interstitial pneumonia is a disease peculiar to a certain age; therefore in its pathogenesis the actual stage of the young infant should be given ample consideration«.

SUMMARY

A species of blastomyces was recovered from the lungs of four premature infants dead of interstitial pneumonia. We have described the morphological and biochemical properties of that fungus and determined its place in taxonomy. The fungus belongs to the ordo Endomycetales, series Saccharomyceteal. A more accurate classification will be possible only after extensive genetical investigations have been made. Disease was induced experimentally in animals and thereby we succeeded in producing the asci of the fungus, which were found to be morphologically similar to the structure described by *Jirovec* as »characteristic« of interstitial pneumonia.

It could be proved by experimental methods that Jirovec' »characteristic« structure is not the sporogonium of some protozon, but the ascus of the fungus we had isolated.

Rabbits and mice were made to aspire a suspension of the fungus. These animals developed subsequently a disease similar to the interstitial pneumonia of premature infants; the pathological, histological and mycological findings were also comparable to those found in infants. To our knowledge, this had been the first successful attempt at inducing interstitial pneumonia experimentally.

Finally, it was established that the experimentally induced pathological condition was aggravated by penicillin.

LITERATURE

1. *Surányi, Gy.:* Gyermekgyógyászat, **5**, 1 (1954).
2. *Ádler, T., Gergely, E., Kapus, Gy.* and *Surányi, Gy.:* Gyermekgyógyászat, **3**, 321 (1952).
3. *Lénárt, Gy.:* Gyermekgyógyászat, **3**, 257 (1952).
4. *Surányi, Gy.:* Gyermekgyógyászat, **3**, 148 (1952).
5. *Waltner, K., Diósszilágyi, G., Páldy, L., Török, J.* and *Molnár, L.:* Orvosi Hetilap **94**, 955 (1953).
6. *Surányi, Gy.:* Orvosi Hetilap, **94**, 953 (1953).
7. *Waltner, K., Diósszilágyi, G.* and *Koltay, M.:* Orvosi Hetilap, **94**, 962 (1953).
8. *Baló, J.* and *Schuller, D.:* Orvosi Hetilap, **94**, 966 (1953).
9. *Korpássy, B., Tiboldi, T.* and *Török, J.:* Orvosi Hetilap, **94**, 970 (1953).
10. *Takács, E.:* Orvosi Hetilap, **94**, 1300 (1953).
11. *Csillag, A., Brandstein, L., Fáber, V.* and *Maczó, J.-né:* Orvosi Hetilap, **94**, 1303 (1953)
12. *Surányi, Gy.:* Orvosi Hetilap, **94**, Editorial letter (1953).
13. *Brandstein, L., Csillag, A., Fáber, V.* and *Maczó, J.-né:* Paediatr. Cong. November, 1953. Budapest.
14. *Csillag, A.* and *Brandstein, L.:* Acta Microbiol. Hung. **1** (1954).
15. *Sipos, P.:* Orvosi Hetilap, **95**, 377 (1954).
16. *Csillag, A.* and *Brandstein, L.:* Hungarian Microbiol. Ass., March 26, 1954.
17. *Székely, K.* and *Kövér, B.:* Gyermekgyógyászat, **5**, 122 (1954).
18. *Vanek, I.* and *Jirovec, O.:* Zbl. f. Bakt. **158**, 120 (1952).

19. *Carini* and *Maciel:* Zbl. f. Bakt. **77,** 46 (1916).
20. *Büschner, L., Gleiss, J., Grün, L.* and *Lezzelmann, E.:* Ztschr. f. Kinderheilk. **73,** 217 (1953).
21. *Giese, M.:* Monatschrift f. Kinderheilk. : **101,** 147 (1953).
22. *Simon, H.:* Die Naturwissenschaften, **40,** 625 (1953).
23. *Csillag, A.:* Bőrgyógyászati és Venerológiai Szemle, **25,** 203 (1949).
24. *Skinner, C. E., Emmons, C. W.* and *Tsuchiya, H. M.:* Henrici's Molds, Yeasts and Actinomycetes, New-York, 1948.
25. *Lodder, J.* and *Kreger-VanRij, N. J. W.:* The Yeasts, A Taxonomic Study, Amsterdam, 1952.
26. *Manninger, R.:* Állatorvosi Bakteriológia, Immunitástan és Járványtan, 1950.
27. *Guilliermond, A.:* The Yeasts, New-York, 1920.
28. *Vas, K.:* Acta Chimica Hung. **1,** 207 (1951).
29. *Csillag, A.:* Borbasia **9,** 118 (1949).
30. *Tanner, F. W.:* The Microbiology of foods. Illinois, 1944.
31. *Zoltai, N.:* Personal communication.

РОЛЬ ПОЧКУЮЩИХСЯ ГРИБКОВ В ЭТИОЛОГИИ ПЛАЗМОЦИТАРНОЙ МЕЖУТОЧНОЙ ПНЕВМОНИИ ПРЕЖДЕВРЕМЕННО РОЖДЕННЫХ

А. Чиллаг и Л. Брандштейн

Р е з ю м е

Из легких четырех преждевременно рожденных и умерших вследствие межуточной плазмоцитарной пневмонии, авторы изолировали одинаковые почкующие грибки, описали их морфологические и биохимические свойства и определили, что упомянутые грибки относятся к виду Saccharomyces. Вполне точная классификация, однако, будет возможна только путем более расширенных генетических исследований.

В легких мышей, погибших вследствие аспирации взвеси грибков, были обнаружены 8-ми ядерные образования, описанные Ировецом и его сотрудниками как спорогон простейшего. Формации эти аналогичны 8-ми аскоспоровым аскам аспирированных грибков. На среде, благоприятствующей образованию спор »in vitro«, только свежевыделенные из легких грибки образуют 8-ми споровые аски : у последующих субкультур образуются только односпоровые аски, однако, в легких также и 150-ая субкультура снова образует 8-ми споровые формации. Следовательно, для образования 8-ми ядерных формаций необходимы условия живого организма.

Вышеупомянутыми опытами авторы доказали, что »характерной формацией« является не спорогон простейшего, а аск изолированного ими почкующегося грибка.

Путем аспирации взвеси грибка у кроликов и новорожденных мышат, авторы вызвали заболевание, подобное межуточной пневмонии человека. Результаты патологических, гистологических и микологических исследований у животных весьма подобны таковым в случае межуточной пневмонии человека. По сведениям авторов, они являются первыми, которыми удалось воспроизвести экспериментально межуточную пневмонию.

Наконец, авторы установили, что экспериментально воспроизведенная картина болезни ухудшается на действие пенициллина.

ÜBER EINEN FALL VON COCCIDIOIDOMYKOSE BEI EINEM KANINCHEN IN UNGARN

F. KEMENES

Institut für Seuchenlehre der Veterinärmedizinischen Hochschule, Budapest

(Eingegangen am 12. Juni 1954)

Die Coccidioidomykose ist in verschiedenen Gebieten von Amerika eine wohlbekannte Krankheit sowohl des Menschen, wie verschiedener Säugetiere. Im europäischen Schrifttum liegen jedoch — abgesehen von einigen Fällen beim Menschen, die sich offenbar in Amerika angesteckt hatten — unseres Wissens nur einige Berichte über ihr bodenständiges Vorkommen in Italien und der Balkanhalbinsel vor. Es dürfte daher von Interesse sein, den ersten Fall von Coccidioidomykose in Ungarn kurz zu beschreiben, den wir bei einem Kaninchen aus der Umgebung von Budapest festzustellen Gelegenheit hatten.

Es handelte sich um einen chronischen Fall, wo sich bei der Zerlegung eines stark abgemagerten alten Kaninchens in den Lungen, der etwas vergrösserten Milz und der Leber teils zerstreut, teils dichtgelagert hanfsamen- bis erbsengrosse, grauweisse, derbe Herde befanden, die jedoch keinerlei Zeichen einer Verkäsung oder Verkalkung aufwiesen. In den Herden liessen sich in nach Ziehl-Neelsen gefärbten Ausstrichpräparaten weder Tuberkelbazillen noch andere Bakterien nachweisen, wohl aber an Coccidien erinnernde Gebilde mit doppelt-konturierter Hülle. Sie hatten einen Durchmesser von 20—60 μ, und in den grösseren liessen sich in reichlicher Menge Körnchen (Endosporen) nachweisen (Abb. 1.). Es zeigte sich, dass es sich hier um Zysten von Coccidioides immitis handelte. Auf Agarnährböden gingen nämlich schon 24 Stunden nach ihrer Beschickung mit Krankheitsmaterial aus Lungen und Milz bei 38° 2—4 mm grosse, grauweisse, dem Nährboden fest anhaftende, an Streptomyceskulturen erinnernde Kolonien auf, die dann auf verschiedene andere flüssige und feste Nährböden übertragen wurden. Besonders üppige Kulturen erhielten wir auf Maltose- und Leberbrühagar, wo die Kolonien nach einer Woche einen Durchmesser von 0,5—1,0 cm erreichten. Dabei verliehen die mittlerweile zu einer Länge von 2—3 mm heranwachsenden Lufthyphen den Kolonien ein weisses, watteähnliches Aussehen. Später nahmen sowohl die Oberfläche der Kolonien wie der Agar selbst eine sich allmählich verstärkende braune Farbe an. Die Kolonien bestanden aus einem Mycel langer, verzweigter Fäden, Hyphen (Abb. 2.), in denen sich gegen ihr freies Ende zahlreiche, perlschnurartig gelagerte Chlamydosporen befanden. In Bouillon wuchs der Keim in Form feiner grau-

weisser Flöckchen, die mit der Zeit sich allmählich vergrösserten und dabei, ebenso wie die Bouillon, braun wurden.

Dass es sich in dem beschriebenen Fall tatsächlich um Coccidioides immitis handelte, geht daraus hervor, dass es uns gelungen ist, das typischste

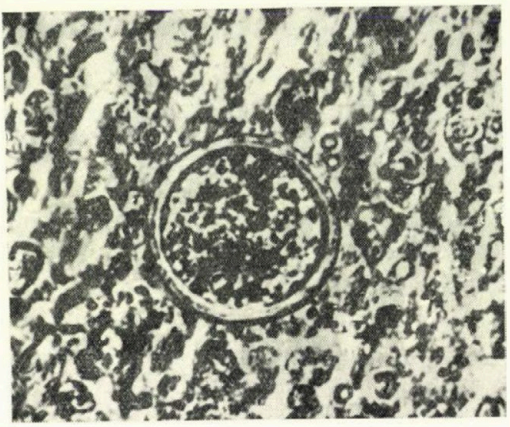


Abb. 1. Zyste im Ausstrichpräparat aus Lungengewebe (1000 : 1)

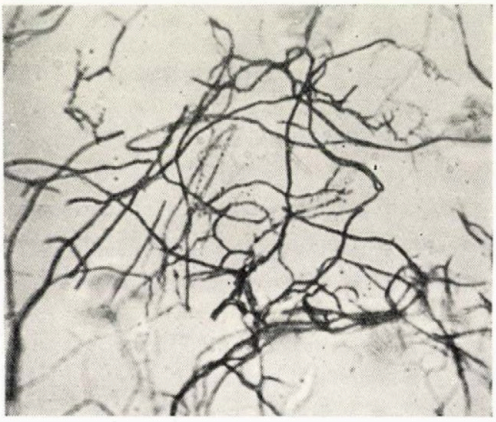


Abb. 2. Hyphen aus Kultur auf Maltoseagar (1000 : 1)

Merkmal des Keimes nachzuweisen, nämlich im kranken Gewebe den parasitierenden Zyklus in Form der Zysten und ausserhalb des tierischen Körpers, in den Kulturen, den vegetativen in Form des Mycels.

Mit Kulturmaterial wurden auch weisse Mäuse infiziert. Die intravenös geimpften Tiere starben ausnahmslos binnen einigen Tagen, nachdem sich bei ihnen schwere Atemnot eingestellt hatte. Aus den Lungen konnten in jedem

Falle der Krankheitserreger reingezüchtet werden, und in den mikroskopischen Präparaten fanden sich in Gesellschaft von reichlich vielen entzündlichen Zellelementen, hauptsächlich von neutrophilen Granulozyten, stark gebogene

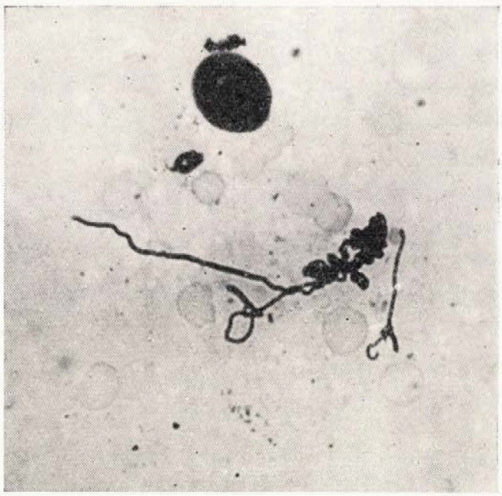


Abb. 3. Hyphen mit Ansätzen zur Zystenbildung aus der Lunge einer Maus (1000 : 1)

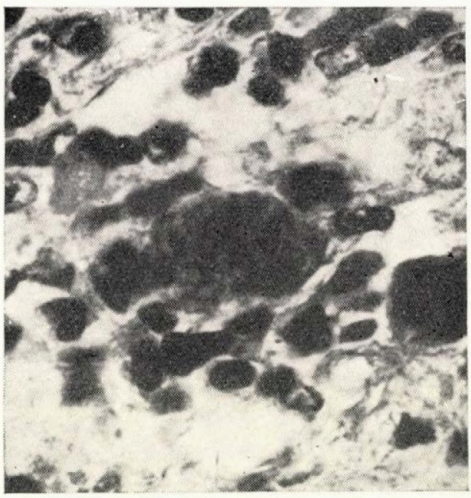


Abb. 4. Zyste in Granulationsgewebe ; histologisches Präparat aus der Lunge des Kaninchens (1000 : 1)

Fäden mit Ansätzen zur Zystenbildung (?). Ausgebildete Zysten gelang es uns jedoch nicht nachzuweisen (Abb. 3.). Von den intraperitoneal infizierten Mäusen starb rund ein Drittel 3 Wochen nach der Ansteckung. Hier liessen sich im

Exsudat der Bauchhöhle, in einem Teile der Fälle auch in den Lungen und der Milz, bereits fertige Zysten nachweisen, anderseits ging aus diesem Material auch die Kultur in Form mycelhaltiger Kolonien an.

Die Organe des Kaninchens wurden nachträglich auch histologisch untersucht. Die charakteristischen Zysten wurden auch in den Schnitten inmitten von Granulationsgewebe angetroffen (Abb. 4.).

Der mitgeteilte Fall beansprucht insofern Beachtung, als er beweist, dass mit dem Vorkommen der Coccidioidomykose bei der Diagnosestellung auch bei uns gerechnet werden muss.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird ein Fall von Coccidioidomykose bei einem Kaninchen beschrieben. Es handelt sich um den ersten Fall dieser Krankheit in Ungarn.

LITERATUR

Hagan, W. A. und *Bruner, D. W.:* The Infectious Diseases of Domestic Animals, London 1951. 491 (Lit.).

Mohr, L. und *Staehelin, R.:* Handbuch der inneren Medizin von Bergmann, Frey und Schwiegk. Vierte Auflage. Berlin 1952. **I**, 931 (Lit.).

СЛУЧАЙ КОКЦИДИОИДОМИКОЗА КРОЛИКОВ В ВЕНГРИИ

Ф. Кеменеш

Резюме

Описание случая кокцидиоидомикоза (coccidioidomykosis) кроликов с ознакомлением свойств возбудителя болезни. Это является первым случаем болезни, обнаруженным в Венгрии.

STUDIES ON THE INFECTIVITY OF INFLUENZA VIRUS MULTIPLYING IN THE MOUSE LUNG

By
J. SINKOVICS and E. MOLNÁR

State Institute for Public Health, Budapest

(Received June 18, 1954)

Hoyle [1] in 1948, *Henle* and *Henle* [2] in 1949 reported that influenza virus inoculated into embryonated hen eggs loses its haemagglutinating and infecting capacity during intracellular multiplication. After the new virus generation had developed, these properties reappear with increased intensity.

At first, this phenomenon was studied only in the chick embryo. Since the autumn of 1949, we have studied the changes occurring in the infectivity of a chick embryo adapted line of the influenza virus in the mouse lung. It was found that, following an initial significant decrease of a few hours' duration, the infectivity of the virus rose to several times the initial value [3]. After these examinations had been completed, similar observations were reported by *Davenport* and *Francis* [4] for strains of influenza virus adapted to the chick embryo and inoculated into mouse lung. They, however, failed to demonstrate any significant reduction in the infectivity of the mouse-adapted virus during the first few hours following inoculation into the mouse lung. We have then decided to re-examine the problem of viral multiplication, using this time a strain of influenza virus adapted to mouse lung.

Material and Methods

Virus. The influenza virus strain used was PR8 of type A, serially passaged in the allantoic sac of the chick embryo and simultaneously also in mouse lung. The allantoic sac line of the virus was capable of infecting 50 per cent of the inoculated chick embryos at a dilution as high as $10^{-7,5}$ (ID_{50}). The mouse-lung-adapted virus killed 50 per cent of the mice inoculated (LD_{50}) in a dilution of $10^{-6,5}$.

Infection of mice and estimation of the amount of virus in mouse lungs. Mice anaesthetized with ether were inoculated with accurately measured amounts of virus. In most instances the method consisted in introducing a 20-gauge needle, with its tip blunted and bent, into one of the nostrils. In other cases infection was performed by instillation. On a few occasions intrapulmonary inoculations were made through the right chest wall. Immediately after infection, then in 1 hour intervals, groups of 5 to 8 mice each were killed by bleeding, the lungs were pooled, precisely weighed, ground and examined for infectivity by titration in the allantoic sac of the chick embryo or in the mouse lung. Eight to ten embryos or mice were inoculated with each dilution. Under favourable conditions this may allow for significant evaluation of a twofold difference between the infective titres of two virus samples. [5] Amounts of virus were expressed in terms of ID_{50}, or LD_{50}, calculated by the method of *Reed* and *Muench* [6]. Two methods were used of titrating virus. 1.) In the case of chick-embryo-adapted virus, the weight of the mouse lung was divided

by 0,05, or by 0,1, according to the volume of the infective dose used in the next titration; the value of ID_{50} for the whole lung was divided by the result of the former division and the quotient showed the number of ID_{50} per 0,1 or 0,05 g of lung tissue from the initially inoculated amount of virus. Titration was carried out in the chick embryo and evaluated on the basis of the haemagglutinating ability of the single allantoic fluids. The results indicate how much infective virus can be recovered at different points of time after infection, instead of the amount of virus inoculated. 2.) In the case of mouse-lung-adapted virus, the LD_{50} units of the lungs from mice killed by bleeding 5 minutes after infection were determined and the amounts of virus recoverable from the lungs of mice sacrificed at later points of time were compared to this value. The two methods yielded essentially similar results.

Results

Between September, 1949, and June, 1951, a total of 40 experiments were made. According to the results, approximately 70 to 99 per cent of the inoculated virus disappears in the lung tissue within 1 to 2 hours after infection through the intranasal route (Table I). In this initial stage of viral multiplication no virus could be demonstrated in the blood, brain, liver and spleen of the infected mice. Virus introduced directly into the lungs by means of intrapulmonary inoculation lost its infectivity in a similar way. This fact appears to indicate that the amount of virus disappearing in the lung following intranasal inoculation did not remain in the upper respiratory tract, but became non-infective in the pulmonary tissue proper. This is in accordance with the pathohistological findings reported in 1938 by *Dal*[7] that influenza infection of the mouse, in contrast to that of man, is restricted to the lower respiratory tract (lung tissue).

TABLE I

Infective, chick-embryo-adapted influenza virus in mouse lung, during the first hours following infection

log ID_{50} units/0,1 g lung tissue at 0 following infection	at 1 following infection	at 2 following infection	at 4 1/2 hours following infection
5,75	3,43	—	—
5,83	3,36	—	—
6,05	—	5,10	—
5,75	—	4,33	—
5,83	—	4,14	—
6,11	—	—	5,90*
5,75	—	—	4,00

* In this experiment the occurrence of the so-called »auto-interference« has to be taken into consideration.

TABLE II

First cycle of growth of chick-embryo-adapted influenza virus in mouse lung

Date of experiment	log ID_{50}/0,05 g lung tissue at 0 following infection	at 4 following infection	at 7 hours following infection
April 14th 1950	3,20	2,30	5,17
April 24th «	3,20	2,60	5,00

TABLE III

First cycle of growth of mouse-lung-adapted influenza virus in mouse lung

log LD_{50} units/0,05 g lung tissue at 0 following infection	at 1 1/2 following infection	at 3 following infection	at 4 1/2 following infection	at 7 hours following infection
3,38	1,40	2,00	3,71	4,87
2,15	$<$1,00	$<$1,00	2,00	3,75

In the second series of experiments we examined the virus content of the infected lungs 4 and 7 hours following intranasal inoculation of influenza virus (Table II). The data in Table II clearly show that 7 hours after intranasal infection the amount of infective virus in the mouse lung is several times higher than that introduced by inoculation.

In 1954, two series of experiments were carried out with the purpose to examine the changes in infectivity of the mouse-lung-adapted influenza virus following inoculation into mouse lung (Table III). It follows from the results that a loss of infectivity occurs during the first few hours even if mouse-lung-adapted virus has been used for infecting mice.

Discussion

Experimental evidence has been obtained to show that influenza virus multiplying in the respiratory epithelium loses its infectivity until the new generation has come into existence. Virus particles which did not enter susceptible cells retain their infectivity and may consequently be recovered by titration from the ground lung tissue. This transient loss of infectivity, in

contrast with the observations of *Davenport* and *Francis*, occurs with chick-embryo-adapted and mouse-lung-adapted virus strains alike. *Davenport* and *Francis* titrated only immediately after, and then beginning from the 6th hour after infection. By this method they observed loss of infectivity in case of chick-embryo-adapted, but not in case of mouse-lung-adapted virus strains. Our experiments yielded results indicating that the growth cycle of PR8 virus adapted to mouse lung is apparently shorter in mouse lung tissue than is that of the chick-embryo-adapted line. This explains the fact that in the case of the mouse-lung-adapted line of the influenza virus no more loss of infectivity is observable $4\frac{1}{2}$ hours following infection.

The values obtained 7 hours following the infection do not give an accurate picture of the actual rate of virus multiplication, since by that time part of the new virus generation had apparently invaded new susceptible cells and had lost its infectivity.

Theoretically there are two ways for explaining the loss of infectivity exhibited by the multiplying influenza virus. 1. Viruses that had penetrated the cells, disintegrate and an auto-reproduction of non-infectious nucleoprotein components released from them is beginning to take place. [8] 2. The influenza virus undergoes changes similar to that described for the growth cycle of the so-called large viruses ; the large viruses increase in size and, by multipolar fission, fall apart into elementary bodies ; the swollen forms are less infective [9]. Similar forms of influenza virus have frequently been encountered under the electron-microscope, as spherical, filamentous or other swollen structures [10, 11, 12, 13].

SUMMARY

Influenza virus multiplying in susceptible cells of the mouse lung undergoes a change and loses its infectivity. During this time a new virus generation is being formed in the cells, as suggested by the fact that 7 hours following infection a sudden increase in the amount of virus is observable. This phenomenon can be demonstrated with both chick-embryo-adapted and mouse-lung-adapted strains of virus after inoculation into mouse lung. The growth cycle of the virus adapted to mouse lung is, however, shortened and the natural decrease of infectivity is observable only for a few hours immediately following infection.

LITERATURE

1. *Hoyle, L.* : Brit. J. Path. **29,** 390 (1948).
2. *Henle, W.* : J. exp. Med. **90,** 1 (1949) ; ibid. **90,** 13 (1949) ; — *Henle, W., Henle, G.* : J. exp. Med. **90,** 23 (1949).
3. *Sinkovics, J., S. Molnár, E.* : Kísérletes Orvostudomány. In Press.
4. *Davenport, M., Francis, T. Jr.* : J. exp. Med. **93,** 929 (1951).
5. *Knight, C. A.* : J. exp. Med. **79,** 487 (1944).
6. *Reed, L. J., Muench, H.* : Am. J. Hyg. **27,** 493 (1938).
7. *Даль М. Ц.* : Арх. Биол. Наук **52,** 86 (1938).
8. *Hoyle, L.* : J. Hyg. **48,** 277 (1950). — The Nature of Virus Multiplication, Cambridge, 225 (1953).
9. *Bauer, D. J.* : Nature **164,** 767 (1949).

10. *Eddy, B. E., Wyckoff, R. W. S.:* Proc. Soc. exp. Biol. Med. **75,** 290 (1950).
11. *Feltynowsky, A., Zych, Z.:* Med. doswiad. mikrobiol. **5,** 423 (1953).
12. *Товарницкий, В. И.:* Природа **3,** 95 (1953).
13. *Edward, D. G.:* J. gen. Microbiol. **10,** 27 (1954).

ИССЛЕДОВАНИЕ ЗАРАЗИТЕЛЬНОСТИ РАЗМНОЖАЮЩЕГОСЯ ВИРУСА ГРИППА В ЛЕГКИХ МЫШЕЙ

И. Шинкович и *Э. Мольнар*

Резюме

Вирус гриппа, размножающийся в восприимчивых клетках легких мышей, настолько изменяется внутри клеток, что он при пересеве с растертой клеткой на новые восприимчивые ткани теряет свою заразительность, но в то-же время начинается и происходит образование новой генерации вируса, о чем свидетельствует внезапное повышение количества вирулентных вирусов на седьмой час после заражения. Явление это наблюдается при культивировании в легких мышей штаммов вируса, адаптированных как к куриному зародышу, так и к легким мышей. Однако, цикл размножения штамма вируса, адаптированного к легким мышей, более короток и естественное понижение заразительности наблюдается только в течение первых часов после заражения.

A kiadásért felel: az Akadémiai Kiadó igazgatója Műszaki felelős: Farkas Sándor
Kézirat beérkezett: 1954. IX. 2. — Terjedelem: 17½ (A/5) ív, 62 ábra

33443/54 Akadémiai Nyomda, Gerlóczy-u. 2. Felelős vezető: ifj. Puskás Ferenc

INDEX

Szabó, I.: Beiträge zur Verbreitung der Tuberkulose des Bovintyps in Ungarn — — *Сабо, И.:* Данные о распространенности туберкулеза бычьего типа в Венгрии 3

Szabó, I.: Neue Gesichtspunkte bei der Isolierung von Antibiotika erzeugenden Bodenmikroben — *Сабо, И.:* Новые точки зрения при поисках почвенных микробов, образующих антибиотики 9

Horváth, J., Marton, M. und *Oroszlán, I.:* Vegetative Hybridisationsversuche an Streptomyces — *Хорват, Я., Мартон, М.* и *Оросланн, И.:* Вегетативные гибридизационные эксперименты на видах Streptomyces 21

Krámli, A., Pettkó, E. F. und *Kiss, P.:* Wirkung von Schwermetallen auf Atmung und Redoxpotential von Streptomyces Griseus-Kulturen — *Крамли, А., Петтко, Э. Ф.* и *Кушш, П.:* Влияние тяжелых металлов на дыхание и окислительно-восстановительный потенциал культур Streptomyces griseus 39

Balassa, R.: Transformationsmechanismen der Rhizobien — *Балашша, Р.:* Механизм трансформации ризобиумов 51

Vályi-Nagy, T., Csobán, G. and *Zabos, P.:* Effect of Penicillin on the Nucleic Acid Metabolism of Staphylococcus aureus — *Вайи-Надь, Т., Чобан, Г.* и *Забош, П.:* Действие пенициллина на обмен веществ нуклеиновой кислоты культур — Staphylococcus aureus 79

Oláh, P.: Production of Antitetanus Serum in Cattle — *Олах, П.:* Данные к производству противостолбнячной сыворотки у рогатого скота 91

Takátsy, Gy. and *Fürész, J.:* The Antigenic Structure of Influenza Virus as Studied by a Simple Immune Serum Absorption Test — *Такачи, Дь.* и *Фюрес, Я.:* Исследование антигенной структуры вируса гриппа простым методом истощения иммунных сывороток 105

Ivánovics, G., Horváth, S. and *Szőllősy, E.:* The Influenza Virus Adsorbing Capacity of the Vascular Endothelium of Various Mammals — *Иванович, Г., Хорват, И.* и *Сёллёши, Э.:* Способность эндотелия млекопитающих животных к связыванию вируса гриппа 121

Petrilla, A.: Epidemiological Characteristics of the 1953 Influenza Epidemic in Hungary — *Петрилла, А.:* Эпидемиологические особенности эпидемии гриппа 1953 года в Венгрии 131

Krámli, A., Pulay, G. und *Lantos, J.:* Eine Methode zur Sammlung von sterinoxydierenden Mikroorganismen — *Крамли, А., Пулаи, Г.* и *Лантош, Я.:* Простые методы селекции стеринокислительных микроорганизмов 145

Béládi, I. und *Ivánovics, G.:* Immunisierung von Laboratoriumstieren mit dem Virus der Aujeszkyschen Krankheit nach dessen Inaktivierung mit Ultravioletstrahlen — *Белади, И.* и *Иванович, Г.:* Иммунизация лабораторных животных вирусом Ауесского, инактивированным ультрафиолетовыми лучами 151

Pintér, M. and *Balázs, V.:* Studies on Coxsackie Virus Infections in Hungary I. Isolation and Identification of Coxsackie Virus Strains — *Пинтер, М.* и *Балаж, В.:* Изучение инфекций вызываемых вирусом Coxsackie в Венгрии. I. Выделение и идентификация штаммов вируса Coxsackie 161

Váczi, L. and *Uri, J.:* Studies on the Enzyme Penicillinase — *Ваци, Л.* и *Ури, Й.:* Исследование пенициллиназы 167

Csillag, A. and *Brandstein, L.:* The Role of a Blastomyces in the Aetiology of Interstitial Plasmocytic Pneumonia of the Premature Infant — *Чиллаг, А.* и *Брандштейн, Л.:* Роль почкующихся грибков в этиологии плазмоцитарной межуточной пневмонии преждевременно рожденных 179

Kemenes, F.: Über einen Fall von Coccidioidomykose bei einem Kaninchen in Ungarn — *Кеменеш, Ф.:* Случай кокцидиоидомикоза кроликов в Венгрии 191

Sinkovics, J. and *Molnár, E.:* Studies on the Infectivity of Influenza Virus Multiplying in the Mouse Lung — *Шинкович, Й.* и *Мольнар, Э.:* Исследование заразительности размножающегося вируса гриппа в легких мышей 195

Les Acta Microbiologica paraissent en russe, français, anglais et allemand et publient des travaux du domaine de la microbiologie.

Les Acta Microbiologica sont publiés sous forme de fascicules qui seront réunis en un volume.

On est prié d'envoyer les manuscrits destinés à la rédaction, et écrits à la machine, à l'adresse suivante :

Acta Microbiologica, Budapest, Keleti Postahivatal, Postafiók 64.

Toute correspondance avec la rédaction doit être envoyée à cette même adresse.

Le prix de l'abonnement est de 110 forints par volume.

On peut s'abonner à l'Entreprise pour le Commerce Extérieur de Livres et Journaux «Kultúra» (Budapest, VI., Sztálin-út 21. Compte-courant No. 43-790-057-181) ou à l'étranger chez tous les représentants ou dépositaires.

The Acta Microbiologica publish papers on microbiological subjects in Russian, French, English and German.

The Acta Microbiologica appear in parts of varying size, making up one volume.

Manuscripts should be typed and addressed to

Acta Microbiologica, Budapest, Keleti Postahivatal, Postafiók 64.

Correspondence with the editors should be sent to the same address.

The rate of subscription to the Acta Microbiologica is 110 forints a volume. Orders may be placed with »Kultúra« Foreign Trade Company for Books and Newspapers Budapest, VI., Sztálin-út 21. Account No. 43-790-057-181) or with representatives abroad.

Die Acta Microbiologica veröffentlichen Abhandlungen aus dem Bereiche der Mikrobiologie in russischer, französischer, englischer und deutscher Sprache.

Die Acta Microbiologica erscheinen in Heften wechselnden Umfanges. Mehrere Hefte bilden einen Band.

Die zur Veröffentlichung bestimmten Manuskripte sind, mit Maschine geschrieben an folgende Adresse zu senden :

Acta Microbiologica, Budapest, Keleti Postahivatal, Postafiók 64.

An die gleiche Anschrift ist auch jede für die Redaktion bestimmte Korrespondenz zu richten.

Abonnementspreis pro Band 110 Forint. Bestellbar bei dem Buch- und Zeitungs-Aussenhandels-Unternehmen »Kultúra« (Budapest, VI., Sztálin-út 21. Bankkonto Nr. 43-790-057-181) oder bei seinen Auslandsvertretungen und Kommissionären.

50,— Ft

ACTA MICROBIOLOGICA

ACADEMIAE SCIENTIARUM HUNGARICAE

ADIUVANTIBUS
D. FEHÉR†, J HORVÁTH, S. KOTLÁN, R. MANNINGER,
A. PELC, J. SZIRMAI

REDIGIT
G. IVÁNOVICS

TOMUS II FASCICULUS 3

MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA
BUDAPEST, 1955

ACTA MICROBIOLOGICA

A MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA MIKROBIOLÓGIAI KÖZLEMÉNYEI

KIADÓHIVATAL: BUDAPEST, V., ALKOTMÁNY UTCA 21

Az Acta Microbiologica orosz, francia, angol és német nyelven közöl értekezéseket a mikrobiológia tárgyköréből.

Az Acta Microbiologica változó terjedelmű füzetekben jelenik meg. Több füzet alkot egy kötetet.

A közlésre szánt kéziratok, géppel írva, a következő címre küldendők:

Acta Microbiologica, Budapest, Keleti Postahivatal, Postafiók 64.

Ugyanerre a címre küldendő minden szerkesztőségi levelezés.

Az Acta Microbiologica előfizetési ára kötetenként belföldre 80, külföldre 110 Ft. Megrendelhető a belföld számára az Akadémiai Kiadónál (Budapest, V., Alkotmány utca 21. Bankszámla 04-878-111-46), a külföld számára pedig a »Kultúra« Könyv és Hírlap Külkereskedelmi Vállalatnál (Budapest, VI., Sztálin út 21. Bankszámla: 43-790-057-181) vagy külföldi képviseleteinél és bizományosainál.

»Acta Microbiologica« публикует трактаты из области микробиологии на русском, французском, английском и немецком языках.

»Acta Microbiologica« выходит отдельными выпусками разного объема. Несколько выпусков составляют один том.

Предназначенные для публикации рукописи (в напечатанном на машинке виде) следует направлять по адресу:

Acta Microbiologica,
Budapest, Keleti Postahivatal, Postafiók 64.

По этому же адресу направлять всякую корреспонденцию для редакции.

Подписная цена »Acta Microbiologica« — 110 форинтов за том. Заказы принимает предприятие по внешней торговле книг и газет »Kultúra« (Budapest, VI., Sztálin út 21. Текущий счет № 43-790-057-181), или его заграничные представительства и уполномоченные.

TURBIDIMETRIC MEASUREMENT OF MICROBIAL DENSITY

By

K. VAS

Institute for Research in Canning, Meat Packing and Refrigeration

(Received February 20, 1954)

There are numerous methods for estimating the number of cells («cell count») or volume of cellular substance («microbial density») per unit volume in cultures of microorganisms. If we are concerned with *viable cells* only (*i. e.* with those capable of multiplication) cultural methods, such as the plate count or dilution methods, should be employed. If the *total number of cells* is to be determined, one or another of the methods, direct or indirect, should be taken into consideration. So, for instance, counting under the microscope (in the chamber of a haemocytometer), estimation of solids by filtration or centrifugation, determination of the nitrogen content of the cell mass, or estimation of some metabolite peculiar to the organism in question etc. may be the method of choice. Recently, preference has been given to methods based upon the measurement of the cloudiness of microbial suspensions either by means of turbidimetric procedures, or by nephelometry, the former being based on measuring the quantity of light absorbed, the latter on determining the quantity of light scattered, by the suspension. These methods have been evolved in the period between 1920—30. (In this connection we refer to the papers by *Gärtner* and *Páter* [1], and *Muntner* [5].) Turbidimetry and nephelometry are the most convenient, most rapid methods in general use to-day which may efficiently be employed in routine work.

Experience has shown (*e. g. Monod* [4]) that if the cells in the suspension are similar in shape, but different in size, the light they will absorb or scatter depends not so much upon the *actual number of organisms per ml*, but rather on the amount of cellular substance per unit volume, *i. e.* on *microbial density*. Anyway, if the cells in the suspension belong to the same order of magnitude, the optical data will permit conclusions to be drawn as to the number of cells.

The methods mentioned are based on the phenomena of light absorption and scattering, respectively. According to *Mestre* [3], light falling on a suspension of microbial cells (P_0) will lose a small amount of its quantity before penetrating the suspension proper due to absorption by, and reflexion from, the glass parts of the apparatus. The remaining light (P_m) is partly absorbed (P_a), partly reflected by the cells (scattered light = P_s), while another part will pass through them unaffected. The rest (P_u) continues to travel in the direction of illumination. Finally, P light will reach the photocell or the measuring device of the apparatus. The optical density (extinction) of the suspension is defined by the equation

$$D = \log\left(\frac{P_m}{P}\right).$$

The value of P is composed of P_u and $d \cdot P_s$, the latter being identical with the quantity of light scattered in the direction of the main beam. In other words

$$D = \log P_m - \log (P_u + d \cdot P_s).$$

In suspensions of higher concentration the value of the factor d is greater, and the value of extinction will be smaller than what could be expected on the basis of microbial density. This accounts for the fact that the relationship between cell density and light absorption, or scattering, is not linear. The optical data for suspensions of known density give a curve, and not a straight line, in the coordinate system. Therefore, such a calibration curve must be plotted in every case and cell density may be assessed from the curve by graphical interpolation, making use of the optical data obtained in the main experiment. Owing to the known difficulties and the inaccuracy of graphical interpolation it would appear desirable to find means allowing to assess microbial density from turbidimetric or nephelometric data with the aid of an equation or a table.

Mestre [3], *Longsworth* [2], and later Toennies and Gallant [6] have made attempts at achieving this. The two former authors devised a photoelectric colorimeter measuring the quantity of light absorbed by suspensions in a glass cuvette. They used white light and *Mestre* demonstrated that suspensions of *Escherichia coli* containing approximately 10^7 to 10^9 cells per ml absorbed light linearly with the density in the extinction range 0,007—0,484, while at higher concentrations the relationship was characterised by a curve. *Longsworth* went further and established for this relationship the equation

$$D = \alpha \cdot C - \beta^2 \cdot C^2,$$

where D represents extinction, C the microbial density, while α and β are constants. This, obviously is the equation of a parabola. With *L. acidophilus*, $\alpha = 0{,}505$ and $\beta = 0{,}0725$; with *S.cerevisiae* Hansen, $\alpha = 0{,}358$ and $\beta = 0{,}0064$, if the value of D fell between 0,004 and 0,433. *Toennies* and *Gallant* further developed the above equation and made attempts at straightening the downward bend of the curve in order to convert the actually measured and corrected (by reduction of the values for the control solution *i. e.* suspending fluid) extinction data (NOD = net optical density = extinction x 1000) into a direct function of microbial density (AOD = absolute optical density = extinction x 1000). They found that by using the formulae

$$\text{AOD} = 5000 - 100 \cdot \sqrt{2500 - \text{NOD}} \quad \text{or}$$

$$\text{AOD} = 1800 - 100 \cdot \sqrt{321{,}33 - 0{,}33\ \text{NOD}}$$

the NOD values in the ranges 0 to 196 and 196 to 1000 resp., could actually be converted into AOD values directly linear with the relative bacterial concentration, at least in the case of *L. arabinosus* 8014, *L. brevis* 8257, *L. casei* 7469, *L. fermenti* 9338, *Leuc. mesenteroides* P-60, 8042, *Str. faecalis* 9790 and *Str. faecalis* 8043. For NOD-s somewhat above 1000 another, more complicated formula is required. The above mentioned authors used a *Coleman* spectrophotometer and a 675 mμ filter. The suspensions were examined in test tubes and the correlation between relative microbial density and AOD was found to be satisfactory. They also presented a calibration table for directly computing AOD from NOD, as found with the lactic acid bacteria examined.

Experimental

As regards the technique of measurements, it should be noted that nephelometric measurements are usually made in test tubes, while the turbidimetric method permits a choice between two possibilities. One of them is the examination of the thoroughly shaken suspension in a cuvette of known layer thickness, with parallel glass walls, the other is measurement in the culture test tube itself. The latter method requires some more recent type of apparatus, such as, for instance the Lumetron or Coleman apparatus, etc. The earlier types must be converted to permit the use of test tubes.

Since in our investigations it was imperative that microbial density be determined in the same low-volume suspension several times within a certain

period of time, the method requiring cuvettes was not practicable. Nephelometry is highly sensitive and consequently cannot be used for measuring greater microbial densities. We had to find therefore means to measure *light absorption* in test tubes. A suitable test tube adapter was constructed, which could be used in the Pulfrich Stufenphotometer, too. The test tube, 18 mm in external diameter, was placed into a 20 mm photometer cuvette filled with water and it was through this system with plane parallel walls that the light travelled passing through a suitable diaphragm 8 mm in diameter. (Figs. 1, 2a and 2b.)

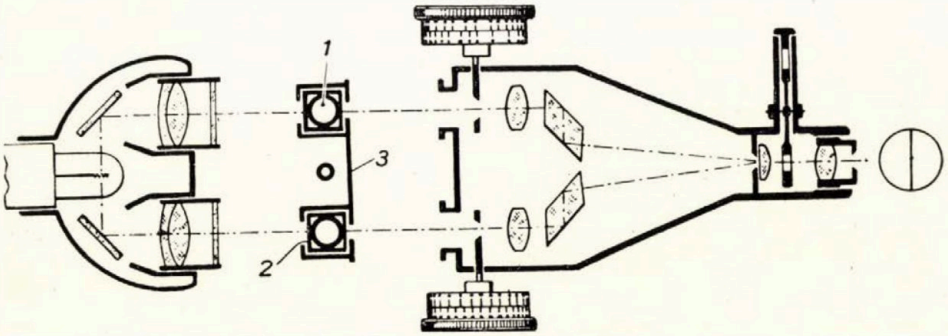


Fig. 1. 1. test tube, 2. cuvette filled with water, 3. tube adapter

In this way disturbing reflexions from the cylindrical surface of the «dry» test tube could completely be eliminated. As a control, a test tube filled with the liquid medium or with the diluent was placed into another 20 mm cuvette on the other side of the adapter.

The filter commonly employed was a 665 mμ one (S 66), because the sterile liquid media used showed the absorption minimum with such a filter.

The practicability of, and sources of error inherent to the method were studied with a few yeasts and bacteria.

First of all, it was determined how uniform in diameter the test tubes in stock were. Forty test tubes measuring 18 by 180 mm, taken at random, were measured with a slide-gauge for external diameter at 2 cm above the bottom and the highest values obtained on rotating the tubes along their longitudinal axes were recorded (Table I). As seen, the slight variations of the diameter do not represent any significant source of error.

Next, the possible error in reading the extinction value was determined. The extinction of the same yeast suspension *(Sacch. cerevisiae* var. *ellipsoideus)* was determined forty times in succession (each measurement is the mean of 3 readings). In order to determine the error of readings for different extinction ranges, more dilute and more concentrated yeast suspension were also included in the tests. 3 readings were taken for each of the 40 values. The results are shown in Table I.

It can be noted that in the extinction range examined the absolute value of the standard deviation did not vary much; its relative value was, of course, the greater the smaller the cell count.

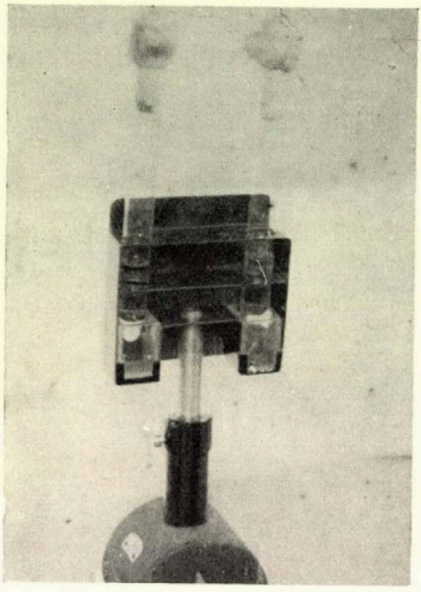


Fig. 2a

Table I

		Mean	Standard deviation	Coeff. of variability %
Variability of test tube diameters (40 test tubes)		17,56 mm	0,25 mm	1,4
	Number of microbes per ml	Extinction		
The same suspension tested in the same test tube 40 times	$4{,}30 \cdot 10^6$	0,289	0,009	3,2
	$8{,}60 \cdot 10^6$	0,554	0,012	2,2
	$1{,}73 \cdot 10^7$	0,949	0,009	1,0
	$3{,}45 \cdot 10^7$	1,430	0,016	1,1
The same suspension tested in 40 different test tubes		0,968	0,018	1,9

It was then examined how the different test tubes used influenced absorption. The same yeast suspension was measured in 40 test tubes (whose diameters were determined as described above) and measured for extinction. The means of each 3 readings were recorded. The mean of the data and the standard deviation are shown in Table I.

It is seen that the errors of the method are not great. The method fulfills the requirements of biological testing.

The evidence obtained on measuring in the above apparatus different dilutions of suspensions of yeasts and bacteria [*Sacch. cerevisiae* var. *ellipsoideus* Tokaj 22 ; Balatonfüred 2, *Torulopsis utilis* var. *maior* (Thaysen & Morris) ; *Corynebact. michinganense ; Bacillus cereus*], as well as re-evaluation of the

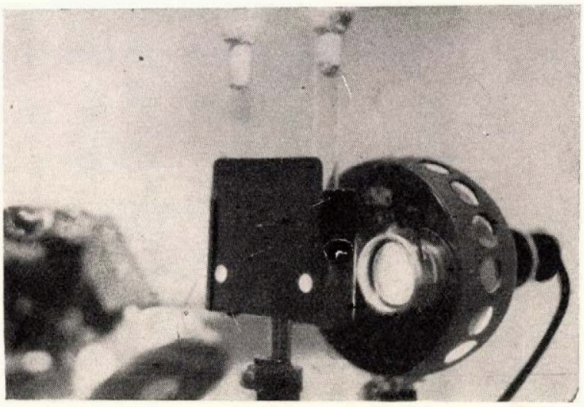


Fig. 2b

Table II

Relative microbial density (x)	Corrected extinction (y)
0,08	0,34
0,12	0,47
0,16	0,58
0,20	0,68
0,24	0,78
0,28	0,86
0,32	0,92
0,35	0,97
0,40	1,05
0,50	1,23
0,60	1,32
0,70	1,42
0,80	1,50
0,90	1,58
1,00	1,65

data reported by *Toennies and Gallant* for *Str. faecalis* [4] lead us to recognise that (i) microbial density and light absorption are in linear relation only at low extinction values and, (ii) the correlation between microbial density and light absorption yielded by suspensions exhibiting absorption up to the extinction range of 1,4 to 1,6, gives a curve not parabolic in shape. Just one example is mentioned here to substantiate this statement.

A suspension of *Sacch. cerevisiae* var. *ellipsoideus* Tokaj 22 was diluted serially with the nutrient medium consisting of peptone, sucrose, sugar, phos-

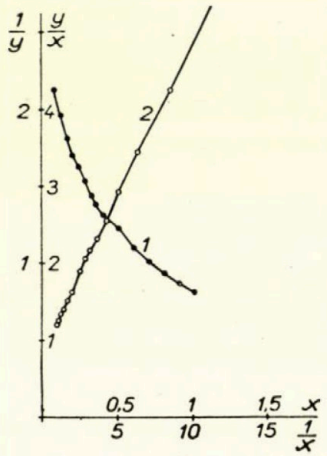


Fig. 3

phate-citric acid buffer and yeast extract. The results are shown in Table II.

If *Longsworth*'s equation is valid, then, on the grounds of the relationships

$$\frac{D}{C} = \alpha - \beta^2 \cdot C, \qquad \text{or} \quad \frac{y}{x} = \alpha - \beta^2 \cdot x$$

(if y is substituted for D and x for C), a straight line should result in case the value of $\frac{y}{x}$ is shown as the function of x. However, as it may be seen in Fig. 3 (curve 1) this is not the case.

An analysis by trial and error of these data and the results derived from other series of measurements shows that the points obtained may be best defined by a hyperbola of the

$$y = \frac{x}{ax + b} \text{ type.}$$

If the values of $\frac{1}{y}$ are plotted as functions of $\frac{1}{x}$, a straight line will be obtained, except for the lowest extinction values which cannot be determined accurately (curve 2, Fig. 3).

The equation of the hyperbola was computed from the reciprocals of the experimental data, making use of the principle of least squares. Namely,

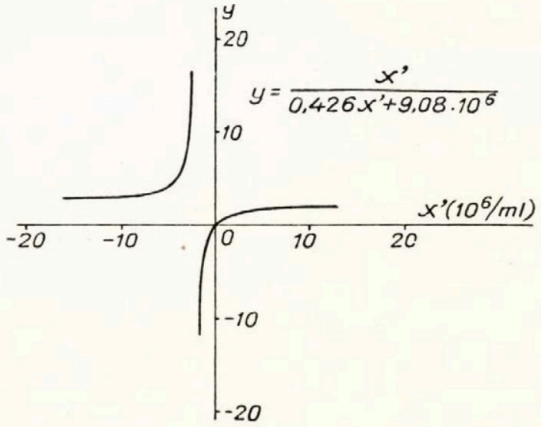


Fig. 4

if $\frac{1}{y} = Y$ and $\frac{1}{x} = X$, the equation may be written in the form,

$$Y = a + bX .$$

On the basis of the principle of least squares, a and b can be computed by solving the equations

$$N \cdot a + b \sum X - \sum Y = O$$
$$a \cdot \sum X + b \sum X^2 - \sum XY = O$$

Computed for the above example

$$15\ a + 56{,}770\ b - 17{,}966 = O$$
$$56{,}77\ a + 346{,}692\ b - 96{,}917 = O$$
$$a = 0.426$$
$$b = 0.204$$

The linearity of the $Y = 0{,}426 + 0{,}204\ X$ relationship is indicated by the fact that the sum of the squares of the deviations of Y-s from their mean is 5,9024, of which 5,8975 is accounted for by linear regression.

Thus, microbial density (x) and extinction (y) are correlated according to the equation

$$y = \frac{x}{0{,}426 \cdot x + 0{,}204}.$$

If the values of x are expressed not in terms of relative concentration, but as number of cells as counted in the haemocytometer chamber (x'), then, $x = 1{,}00$ being equal with $x' = 4{,}45.10^7$/ml cells,

$$x = \frac{x'}{4{,}45 \cdot 10^7},$$

and the above formula is modified as follows (Fig. 4):

$$y = \frac{x'}{0{,}426 \cdot x' + 9{,}08 \cdot 10^3}.$$

Using the above equation for the transformation of light absorption into microbial density, a comparative analysis of computed and actual values is shown in Table III.

Table III

Microbial density (expressed as cell count) (x')	Extinction	
	measured (y_m)	calculated (y_c)
$3{,}6 \cdot 10^6$	0,340	0,336
$5{,}3 \cdot 10^6$	0,470	0,470
$7{,}1 \cdot 10^6$	0,580	0,588
$8{,}9 \cdot 10^6$	0,680	0,692
$1{,}07 \cdot 10^7$	0,780	0,784
$1{,}25 \cdot 10^7$	0,860	0,866
$1{,}42 \cdot 10^7$	0,920	0,940
$1{,}56 \cdot 10^7$	0,970	0,991
$1{,}78 \cdot 10^7$	1,050	1,068
$2{,}23 \cdot 10^7$	1,230	1,199
$2{,}67 \cdot 10^7$	1,320	1,305
$3{,}11 \cdot 10^7$	1,420	1,394
$3{,}56 \cdot 10^7$	1,500	1,468
$4{,}00 \cdot 10^7$	1,580	1,532
$4{,}45 \cdot 10^7$	1,650	1,587

The deviation between computed and actual values averages about 2 per cent for y. The correlation index along the curve is $\varrho = 0{,}99975$.

In Table IV are shown the results of calculations by the above method for a few experiments and for data in the literature.

Table IV

	Microorganism	Circumstances of the test							Constants of the equation of the hyperbola		Average Deviation %
		medium	diluent	container	apparatus	Filter (mμ)	Microbial density (x)' expressed as	The highest extinction value measured	a	b	
Present measurements	1. *S. cerevisiae* var. *ellips.* Tokaj 22	peptone-yeast extract saccharose, pH 4,9	liquid medium	test tube	Pulfrich photometer	665	cell count	1,65	0,426	$0{,}908 \cdot 10^7$	2
	2. *Torulopsis utilis* var. *maior*	«	«	«	«	«	« «	1,47	0,4317	$0{,}7073\ 10^7$	1,0
	3. *Bacillus cereus* vegetative cells	« pH 7,0	«	«	«	«	« «	1,28	0,204	$7{,}55 \cdot 10^7$	2,7
	4. *Bacillus cereus* spores	«	«	«	Photoelectric photometer (devised by author)*	615	« «	0,52	0,722	$7{,}35 \cdot 10^7$	2,9
	5. *S. cerevisiae* var. *ellips.* Balatonfüred 2.	«	distilled water	«	Pulfrich photometer	726	relative value	0,39	0,115	2,449	3,4
	6. *Corynebact. michiganense*	«	«	«	«	«	« «	0,75	0,3235	1,0419	1,2
From the literature	7. *Str. faecalis* 9790**	synthetic	liquid medium	«	Coleman-11-spectrophotometer	675	« «	0,698	0,238	11,433	1,7

* Calculated from transmission (in microlumen) through test tube in cuvette filled with water.

** *Toennies* and *Gallant* [6].

As it may be noted the hyperbola equation can be applied to a wide variety of microorganisms, measured in different apparatuses and under variable conditions.

Provided the cells are of a constant average — standard — size, the extinction values measured can be converted into microbial density or cell count from the calibration points without drawing a curve, and graphical interpolation becomes unnecessary. Conversion is even simpler if microbial density is calculated in advance by means of the formula,

$$x = \frac{b\ y}{1 - a\ y}$$

for each expectable corrected extinction value and the results are listed in a table.

Summary

A test tube adapter has been devised for measuring the turbidity of microbial suspensions in the Pulfrich photometer.

The influence upon the accuracy of measurement of a few factors has been examined.

It has been found that the relationship between microbial density and extinction may be best expressed by the equation of a hyperbola. Applying this equation will make it possible to calculate directly, without graphical interpolation, from calibration data the microbial density for each of the experimental extinction values, or to tabulate the corresponding data in advance.

LITERATURE

1. *Gärtner, St. & Páter, J.:* Zbl. Bakt. **120,** 139 (1931).
2. *Longsworth, L. G.:* J. Bact. **32,** 307 (1936).
3. *Mestre, H.:* J. Bact. **30,** 335 (1935).
4. *Monod, J.:* Ann. Rev. Microb. **3,** 371 (1949).
5. *Muntner, S.:* Ztschr. Hyg. **106,** 50 (1926).
6. *Toennies, G. & Gallant, D. L.:* Growth, **13,** 7 (1949).

ИЗМЕРЕНИЕ ПЛОТНОСТИ ВЗВЕСИ МИКРОБНЫХ КЛЕТОК ТУРБИДИМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

К. Ваш

Резюме

Автор изучал помутнение взвеси микробных клеток в функциях числа микробов или плотности микробных клеток с помощью пробирочного адаптера, приспособленного к фотометру Пульфриха.

Подлежащую исследованию взвесь в пробирке с диаметром в 18 мм помещали в кюветку диаметра 20 мм. С целью избежания мешающих отражений кюветка наполнялась водой и применялась кругообразная диафрагма диаметром в 8 мм.

Автор определил погрешности измерений. Погрешности, возникающие вследствие колебания диаметров набора пробирок, неуверенности считывания экстинкций (при различных плотностях клеток) и применения различных пробирок, оказались не особенно большими.

Автор установил, что в функции плотности клеток помутнение дает гиперболическую корреляцию, которая может быть выражена следующей формулой:

$$y = \frac{x}{ax + b}$$

где y означает поправленную экстинкцию, а x — плотность клеток.

На основании опытов, проведенных с несколькими бактериями и дрожжами, а также путем переоценки одних литературных данных (Toennies Gallant, 1949), вычислив константы a и b вышеприведенного уравнения, автор проверил расхождения между высчитанными и фактическими значениями экстинкций. Корреляция оказалась тесной, а среднее расхождение сравнительно малым.

Применяя вышеуказанную корреляцию, с помощью калибровочных данных могут быть непосредственно (без построения графика) высчитаны или — из заранее изготовленной таблицы — подысканы значения плотности клеток, соответствующие данным экспериментальной экстинкции.

KINETIC STUDIES OF THE FACTORS INFLUENCING MICROBIAL GROWTH

By

K. VAS

Institute for Research in Canning, Meat Packing and Refrigeration

(Received February 20, 1954)

Microbial life is subject to considerable environmental influence. A wide variety of procedure has been used for measuring effects inhibiting or stimulating microbial growth. Most of the earlier methods involved *cultivation for a definite length of time*, after which the fact of multiplication, its accelerated or reduced rate and quantitative relations were assessed by one of the methods used for determining cell count or microbial density. Recently, these «static» methods have given way to «kinetic» studies of growth.

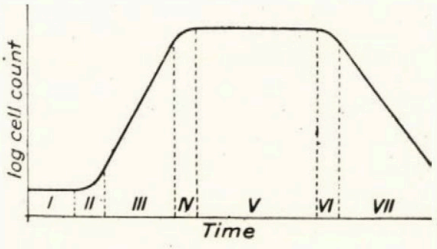


Fig. 1

The laws governing the kinetics of microbial growth have been fairly well elucidated (*Monod* [5]). Particularly detailed informations are available for bacteria and yeasts. Microbial growth has been shown to consist of a number of phases (Fig. 1). The lag or induction phase (I) is followed by a period of increasing growth (II), after that comes the logarithmic phase (III) in which growth is at its maximum and proceeds at an even rate. In the latter phase growth is exponentially related to time and may be expressed in terms of the equation for the kinetics of a monomolecular chemical reaction :

$$n = n_0 e^{k \cdot t} \text{ or } ln \frac{n}{n_0} = k \cdot t,$$

where n_0 is the initial concentration of viable cells, n is the concentration of cells at time t, and k is the growth rate constant.

Phase III is followed by a period of reduced growth rate (IV), after which comes the stationary phase (V). It is in this latter phase that the highest cell count (total growth : G) is reached in the culture. After the lapse of some time the cells begin to die off (VI) and usually an exponential decrease occurs in the cell count (VII).

Chemical agents or other inhibitory factors interfere with this sequence of microbial growth, as manifested with a prolongation of the lag phase (L) with a reduction of growth rate (*i. e.* with a decrease in the k values) and with a diminution of the maximum population (G) (*Hinshelwood* [4]). Stimulators may give rise to opposite effects.

Of the above mentioned phases, the lag and logarithmic phases were studied in most detail. The value of L is usually derived from the growth curve by graphical methods.

Changes in the logarithmic rate of growth are also derived from the growth curve. Recently, attempts have been made to apply this method for estimating the concentrations of penicillin, streptomycin and other inhibitors (*Osgood* and *Gamble* [7]). It was suggested that the concentration of the antibiotic examined was (directly) proportional to the tangent of the angle between the straight sections of the logarithmic growth curves for the test and blank cultures.

Vincent et al. [1, 2, 3, 6] have evaluated the effectivity on moulds and bacteria of various chemicals, on the basis of their growth rate reducing action. In studies concerned with the correlation between chemical structure and fungistatic or bacteriostatic effect they have determined for each of the chemical agents tested the concentration at which the value of the growth rate constant was half of that of the control and expressed it in terms of the negative logarithm of the concentration in millimols («log I_{50}»).

Experimental

The experiments had the purpose of obtaining information on the changes brought about in the different phases of growth by a variety of agents, with special reference to inhibitory effects. Prolongation of the lag phase, the decrease in growth rate and changes in maximum population have been studied.

Principles of the method

The procedure employed consisted essentially of the following steps. In culture media of known viable cell count and containing chemical agents in different concentrations, microbial growth was determined by photometry in relation to time. Duration of the lag phase (L) was derived from the growth curve and was plotted against concentration of the chemical agents. From the growth curves obtained generation times and from them the growth rate constant, (k) were determined graphically. The concentration (m) that would have reduced by exactly 50 per cent the value of k as compared to the controls was calculated. The maximum population (G) reached after the lapse of a certain length of time was determined.

The growth of moulds was estimated on the basis of the increase of colony diameter on the surface of solid media.

Measuring of m, *i. e.* the «medium effective dose» for k, represented a major technical problem. Only after our experiments had been concluded have we become acquainted with the work by *Vincent et al.*, so that it was suggested independently from those authors that the inhibitory effect should be characterized by the concentration required for reducing the growth rate to its half, starting from the assumption that the effectivity of some agent would be better represented by the concentration required for a certain reduction *(e. g.* a 50 per cent one) in the growth rate than by that causing complete inhibition.

We have been compelled to calculate medium effective doses in view of the variability of k values. *Vincent* et al. have not published (at least in the literature available for us) data relative to such calculations.

In the following, measurement of the growth rate, calculation from this of the medium effective dose, changes in the duration of the lag phase and determination of the maximum population will be described.

Subsequently a few examples will be given of how the method was applied in comparative studies involving various chemical agents. The test organisms were : *Sacch. cerevisiae* var. *ellipsoideus*, *Torulopsis utilis* var. *maior*, a strain of *Bacillus cereus* and *Asp. foetidus*. From the growth curves the rate of growth, duration of lag phase and maximum population were calculated.

In evaluating the results we have examined the relationship between growth rate constant, total growth and duration of the lag phase. Attempts have been made to approach the effect on growth rate more closely than is afforded by calculating the medium effective dose. The data on the kinetics of growth were used for drawing conclusions on the eventual mechanism of inhibition. Finally, the data were grouped according to chemicals and, with due consideration to the dissociation constants of the latter, the chemical agents used were evaluated.

Details of the single steps of the study were as follows.

Measurement of the rate of microbial growth

Yeasts. Bacteria

Microbial density, *i. e.* cell mass per volume unit, was determined in a Pulfrich Stufenphotometer, using a 665 mμ filter (S 66). The turbidimetric method used has been described elsewhere *(Vas*, 14).

In the semilogarithmic coordinate system microbial density, expressed now as number of cells per ml, was shown on the ordinate in logarithmic scale, in relation to time shown on the abscissa in linear scale. From the slope of the straight (exponential) section of the growth curve the mean generation time (T = number of hours required for doubling the number of cells) was calculated. From this the rate of exponential growth may be calculated by using the laws characteristic of the kinetics of monomolecular chemical reactions. Namely,

$$kt = \ln \frac{n}{n_0}$$

If $n = 2n_0$, then

$$k = \frac{ln\ 2}{T} \quad \text{or} \quad k = \frac{0{,}693}{T}\ (\text{hour}^{-1})$$

Moulds

As already mentioned, the rate of growth of moulds was measured by determining the rate of increase in colony diameter on the surface of a solid medium. With most moulds, the round colony growing from the drop of spore suspension placed in the centre of the agar plate will increase in diameter in a linear relation to time, except in the lag phase and the subsequent one with increased growth. The increase in millimeters is constant in equal lengths of time *(Tomkins* [13]). This phenomenon may be interpreted in the way that in the phase of linear growth development is governed by the kinetics of a zero-order chemical reaction, where the rate of reaction is independent from the initial concentration, *i. e.* from the cell count, or here, from the initial colony diameter.

$$D = k.t\ ,$$

where D is the diameter of the colony at time t, k is the growth rate constant. Consequently, in the linear phase

$$k = \frac{D}{t} \quad .$$

The increase in colony diameter was measured with a transparent millimeter scale. Measurements were made of the colony growing from a loopful of a spore suspension placed in the centre of a transparent agar medium in a Petri dish. Even the finest increases in diameter visible to the naked eye were considered. Experience has shown that changes occurring at the centre of the colony, such as increase in thickness, spore formation, etc., have no bearing on the rate of marginal growth.

Determination of the medium effective dose

From the growth rate constants observed at various concentrations of the chemica agents applied, the concentration that would have resulted in a k value amounting to half of that of the control was determined in the following way.

The experiments were so devised that the successive members of the concentration series should differ from one another with a constant dilution factor (R), *i. e.* the concentrations should form a geometrical progression.

The concentrations of the chemical shown logarithmically on the abscissa, and the values of k, shown linearly on the ordinate, would result in a zig-zagging curve making it difficult to derive the concentration that would have reduced the growth rate of the blank to exactly its half. Two methods were taken into consideration to overcome this difficulty.

One of them was *calculation of regression.* It was assumed that, as in so many a biological experiment, here, too, the response would be related approximately linearly to the logarithm of the concentration of the chemical at least in the range around 50 per cent inhibition. For the experimental points obtained in that range the regression line was computed and tested for linearity. From the equation of the straight line the concentration causing 50 per cent inhibition and the fiducial limits of this value were computed.

The other method disregarded any theoretical assumption relative to dose-response relationship and the *moving averages* were calculated on an empirical basis. The k values for each of 3 subsequent concentrations were averaged and the means were shown in the graphs at the middle concentration. This method was applied to the entire series. The curves obtained were much smoother in shape. The abscissa belonging to the point of intersection of this curve and the curve for k gives (in logarithmic values) the medium effective dose (m).

The value of m may be calculated also by purely algebraic interpolation. Adapting *Thompson*'s calculations [12], the medium effective dose can be expressed by the equation

$$\log\ m = L_a + \frac{d\,(K-1)}{R} + d \cdot f,$$

where L_a represents the logarithm of the first dose of the concentration series taken into consideration in the calculation of m ; d is the logarithm of the dilution ratio (R) ; K is the number of k values averaged simultaneously and f is represented by the equation,

$$f = \frac{\frac{K}{2} \cdot\ k_0 - k_a - k_{a+1} \ldots\ldots - k_a + K - 1}{k_a + K - k_a} \quad ,$$

where $k_a \ldots k_a + K$ are the growth rate constants for the successive concentrations; and k_t is that for the blank. If

$$K = 3 \ ,$$

then

$$f = \frac{1{,}5 \cdot\ k_0 - k_a - k_{a+1} - k_{a+2}}{k_{a+3} - k_a} \ ,$$

and

$$\log m = \log D_a + \log R \left(1 + \frac{1,5\, k_0 - k_a - k_{a+1} - k_{a+2}}{k_{a+3} - k_a}\right).$$

Of course, this is valid only if

$$0 \leqq f \leqq 1 ,$$

which may be determined by calculating in advance the value of

$$k_a + k_{a+1} + k_{a+2} + k_{a+3} - 1,5\ k_0 .$$

If this falls between the values for k_a and k_{a+3} the value of m is correct. If the values of k are expressed as fractions of k_0, then $k_0 = 1$ and the above equations are simplified. The scattering of m values can be determined by calculating in the usual way the mean and the standard deviation of the log m values for the parallel series.

In order to compare the two methods, the following experiment was performed. A strain of *Saccharomyces cerevisiae* was grown in a saccharose-peptone-yeast medium containing 0, 1,5, 3, 6, 12 and 24 per cent sodium chloride, respectively, in 5 tubes for each salt concentration. The rate of growth was measured at 30° C ; readings were made in 2- to 3-hour intervals and the turbidity values were corrected by subtracting from them the turbidity values for the nutrient solution. The calibration data were expressed in terms of cell count. The generation times (T) calculated from the linear sections of the growth curves gave the k values shown in Table I.

Table I

No. of replication	k values (hour^{-1})					
	Concentration (C) of NaCl (%)					
	0	1,5	3	6	12	24
1	0,41	0,43	0,28	0,15	0	0
2	0,40	0,43	0,26	0,16	0	0
3	0,43	0,43	0,27	0,18	0	0
4	0,40	0,41	0,31	0,17	0	0
5	0,43	,40	0,33	0,19	0	0

Calculation of regression. Disregarding the data for the blank and for complete inhibition ($C = 12$, 24%) the relationship of k to the logarithm of NaCl concentration in the presence of 1,5, 3 and 6 per cent sodium chloride, respectively, ($C = 1,5$ per cent NaCl corresponding to $X = 1$; $C = 3$ per cent NaCl : $X = 2$; $C = 6$ per cent NaCl : $X = 3$, etc.) can be expressed by the equation

$$k = 0,543 - 0,125 \cdot X .$$

If the sodium chloride concentration is expressed (not logarithmically) in per cent (C), then, since

$$X = \frac{\log C - \log C_0}{\log 2} .$$

(C_0 being the salt concentration at $X = 0$, *i. e.* in the present case 0,75 per cent) the former equation is equivalent with

$$k = 0,491 - 0,415 \cdot \log C .$$

From the analysis of the variance shown in Table II, it can be seen that the linear regression is highly significant, while deviation from linearity is not significant.

Table II

	Sum of squared deviations	Degrees of freedom	Mean square	F value	$F_{0,05}$	$F_{0,01}$
Total	0,161534	14	—	—	—	—
Between doses.....	0,156334	2	0,078167	—	—	—
Regression	0,156250	1	0,156250	361	—	—
Deviation from regression	0,000084	1	0,000084	0,19	4,75	9,33
Within doses (error) ..	0,005200	12	0,000433	—	—	—

From the above regression line the medium effective dose (*i. e.* the one at which the mean k of 0,414 for the control is reduced to 0,207) is $m = 4{,}8$ per cent sodium chloride. The 95 per cent fiducial limits are 4,5 and 5,2 per cent NaCl, respectively.

If the calculations include the data of complete inhibition resulting at $C = 12$ per cent NaCl, the experimental points deviate from the linear regression

$$= 0{,}565 - 0{,}138\ X, \quad \text{or} \quad k = 0{,}508 - 0{,}458 \cdot \log C$$

significantly, but not highly so. Further analysis has shown that if the method of orthogonal polynomials is applied to the k values for 1,5, 3, 6 and 12 per cent NaCl, the quadratic item of the regression of k on X is still significant, while the cubic term is not. Applying the equation of the parabola thus calculated, the medium effective dose will be $m = 4{,}9$ per cent NaCl.

Working with the method of *moving averages*, the separate m values are as follows : 4,45, 4,49, 4,38, 4,90, 4,83. The mean of the logarithms of m values is 0,6633147, with a standard error of 0,0099 ; *i. e.* the mean of $m = 4{,}6\%$ NaCl, the 95 per cent fiducial limits are 4,3 and 4,9 per cent sodium chloride, respectively.

Since it was revealed by comparative analysis of a number of similar cases that the results yielded by the two methods were essentially similar in order of magnitude, in further work the more convenient method of the moving averages was usually employed.

Measurement of prolongation of the lag phase

Measurement of prolongation of the duration of the lag phase permits a deeper insight into the mechanism of the effect inhibiting microbial growth. The measurement is usually made by graphical methods. The line of the exponential section of the growth curve is lengthened backwards and the time required for attaining a pre-determined (relatively low) cell count (*e. g.* 10^6/ml) during growth is calculated by extrapolation. This limiting cell count is, of course, arbitrarily chosen. Nevertheless, it should be near to the initial cell count and to the onset of the logarithmic phase.

In the case of moulds, extrapolation was made to a certain small diameter value (10 mm.)

Determination of maximum population

Inhibitory effects may influence also the maximum number of viable cells (G) a given medium will support. The value of G can be simply determined by converting into number of cells — on the basis of calibration data — the maximum extinction values observable at the end of the experiment, after a longer period of stagnant growth. These values are then plotted against concentration.

Application of the method in comparative tests with various chemical agents

To illustrate the method for measuring microbial inhibitory effect as it works, a few experiments are described. The test organisms involved were *Sacch. cerevisiae* var. *ellipsoideus* (Tokaj 22), *Torulopsis utilis* var. *maior* (Thaysen and Morris), *Bacillus cereus* and *Aspergillus*

foetidus. The inhibitory agents were the following compounds : dehydroacetic acid *(DHE*, used in the form of its sodium salt, but expressed as acid except for the *Bacillus)*, the sodium salt of benzoic acid *(BEN-Na)*, sodium formate *(FOR-Na)*, a preparation containing a mixture of the esters of bromoacetic acid *(PAN :* «Pandurol-A», a Danish preservative), and a quaternary ammonium base, cetyl pyridinium bromide *(CPB)*.

Rate of growth

Experiments with *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*

The medium used for growing these organisms consisted of the following ingredients: (1 + 10) yeast extract : 20% v/v ; peptone (Witte) : 0,5% ; sucrose : 1% ; *Mc Ilvaine's* buffer (0,2 M disodium phosphate, 0,1 M citric acid) : 30% v/v, and tap water. The liquid medium was clarified with egg white until crysta clear and sterilised by heating in an autoclave just to reach 130° C.

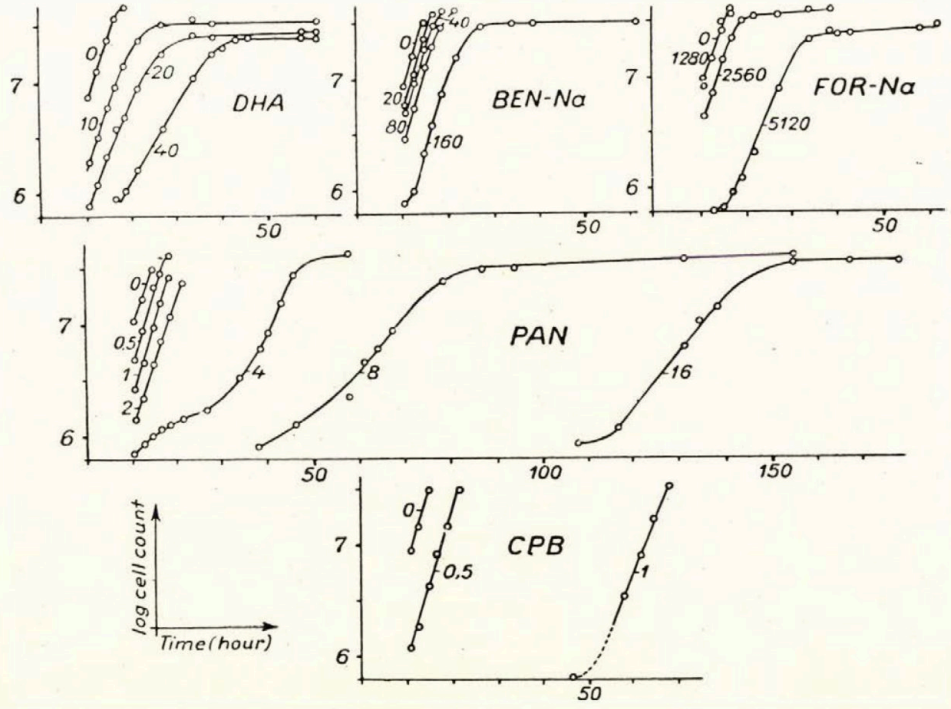


Fig. 2
Figures along the curves indicate the concentration of the chemical (mg/l).

The liquid medium was distributed in 20 ml portions into test tubes of 18 mm external diameter. The chemical agents were added to the medium in the form of concentrated solution in distilled water, applying a dilution ratio of 2.

The media were then inoculated with 0,05 ml of a suspension prepared from a 4-day agar culture of the yeast. The initial total cell count of the samples was $1{,}8.10^5$. The tubes were placed into a water bath and maintained at 31° C. From time to time samples were taken for determination of light absorption in a Pulfrich photometer. The method used for this purpose has been described elsewhere *(Vas* [14]).

From these the growth rate constants (k) were calculated and expressed in terms of fractions of the control k value (Table III).

Table III

Chemical		T (hour)	k		m (mg/l)
sign	concentration mg/l		hour^{-1}	relative value	
DHA	0	2,50	0,277	1,00	35
	10	2,75	0,252	0,91	
	20	3,13	0,221	0,80	
	40	4,63	0,150	0,54	
	80	∞	0	0	
	160	∞	0	0	
	320	∞	0	0	
	640	∞	0	0	
BEN-Na	0	2,25	0,308	1,00	cca. 240*
	20	2,25	0,308	1,00	
	40	2,25	0,308	1,00	
	80	2,25	0,308	1,00	
	160	2,12	0,327	1,06	
	320	∞	0	0	
	640	∞	0	0	
	1280	∞	0	0	
FOR-Na	0	2,88	0,240	1,00	>5120
	80	2,88	0,240	1,00	
	160	2,88	0,240	1,00	
	320	2,88	0,240	1,00	
	640	2,88	0,240	1,00	
	1280	2,88	0,240	1,00	
	2560	2,63	0,263	1,09	
	5120	3,25	0,213	0,89	
PAN	0	2,50	0,277	1,00	8,5
	0,5	2,38	0,291	1,05	
	1	2,38	0,291	1,05	
	2	2,63	0,263	0,95	
	4	3,50	0,198	0,72	
	8	6,25	0,111	0,40	
	16	6,00	0,115	0,42	
	32	∞	0	0	
CPB	0	2,25	0,308	1,00	1,2
	0,5	2,25	0,308	1,00	
	1	2,88	0,240	0,78	
	2	∞	0	0	
	4	∞	0	0	
	8	∞	0	0	
	16	∞	0	0	
	32	∞	0	0	

* In the concentration range 160—320 mg/l a more finely graded series could reveal a more accurate value for *m*.

Experiments with *Torulopsis utilis* var. *maior*

The same chemical agents were tested also against a *Torula*. Experimental conditions, composition of medium, concentrations of the chemicals etc. were identical with those described above, except that the organism inoculated was *Torulopsis utilis* var. *maior* (Thaysen et Morris). From a 5-day agar culture of the organism a suspension was made in sterile water, of which 0,05 ml amounts were used for inoculating the tubes, so that the initial cell count was $3{,}3 \cdot 10^5$ per ml.

Experiments with *Bacillus cereus*

The above mentioned chemical agents were tested also for inhibitory effect upon a strain of *Bacillus cereus*, isolated from green peas. In this instance another nutrient medium had naturally to be used as at around pH 4,7 bacteria usually do not grow.

The nutrient medium consisted of green pea extract: 40% v/v, peptone: 0,5%, sucrose: 0,2% in a phosphate buffer ($M/15$) of pH 7,0. The pea extract was prepared by mixing and centrifuging 1 part of ground green peas and 9 parts of a pH 7,0 phosphate buffer. The solution was clarified with egg white distributed in volumes of 10 ml into test tubes of 18 mm external diameter and sterilised in an autoclave to reach 130° C. The pH of the solution was 7,00.

Except for Pandurol and cetyl pyridinium bromide, the chemical agents were added to the medium in solid form to avoid further dilution (in the case of dehydroacetic acid, the solid sodium salt, DHE-Na was added).

The inoculum was 0,04 ml of a 1-day culture of the organism, containing exclusively vegetative forms. The initial cell count in the inoculated media was $5{,}4 \cdot 10^5$/ml. Incubation occurred at 31° C.

The turbidity of the solutions was measured by the method detailed above [14] and the growth rate constants and medium effective doses were calculated.

Unfortunately, Pandurol was added in concentrations too high (4 mg/l, $k = 0{,}39$) for allowing to determine m. The same is valid for cetyl pyridinium bromide.

Experiments with *Aspergillus foetidus*

A strain of mould was also tested. In this case a solid medium was used, consisting of (1 + 10) yeast extract : 20% v/v ; peptone : 0,5% ; sucrose : 1%, and *McIlvaine*'s citrate-phosphate buffer : 30% v/v ; agar : 5% ; dissolved in tap water. After distribution into test tubes sterilisation was made by steaming. pH was 4,25.

Concentrated solutions of the chemical agents to be tested were measured into Petri dishes, and the heated, melted medium was poured on them, and thoroughly mixed. After the plates had solidified, they were inoculated at the centre with a loopful of a conidium suspension from a 2-week culture of *Aspergillus foetidus*. Incubation was made at 31° C and at intervals the diameter of the colonies was measured (Fig. 3).

The value of k was obtained from calculating the growth in mm per hour.

The concentration of sodium formate, Pandurol and cetyl pyridinium bromide (5120, 32 and 32 mg/l, respectively) was, unfortunately, too low to cause inhibition of around 50 per cent.

Lag phase

In the above described experiments the duration of the lag phase was also determined. It was decided to take as the value of L that time in hours which had elapsed before the initial cell count rose to 10^6/ml with *Saccharomyces* and *Torulopsis*, to 10^7/ml with the *Bacillus*, and before the colony diameter of the *Aspergillus* increased to 10 mm. The L values obtained by graphical extrapolation for the various chemical agents and microbes are shown in Fig. 4.

Maximum population

The maximum population (= total growth = G) was determined in each of the experiments (except that with *Aspergillus*) by the method described. The results grouped according to the chemical agent used are shown in Fig. 5.

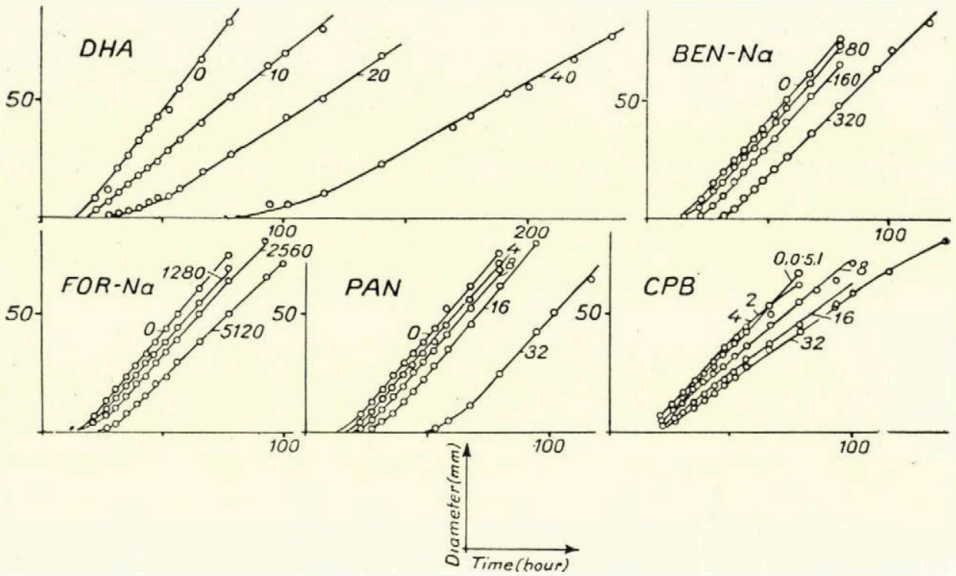


Fig. 3
Figures along the curves indicate the concentration of the chemical (mg/l).

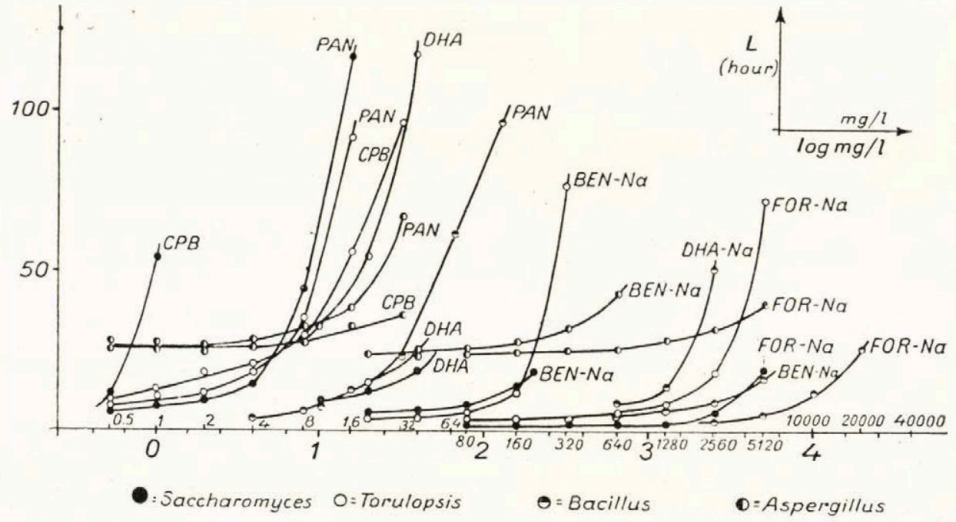
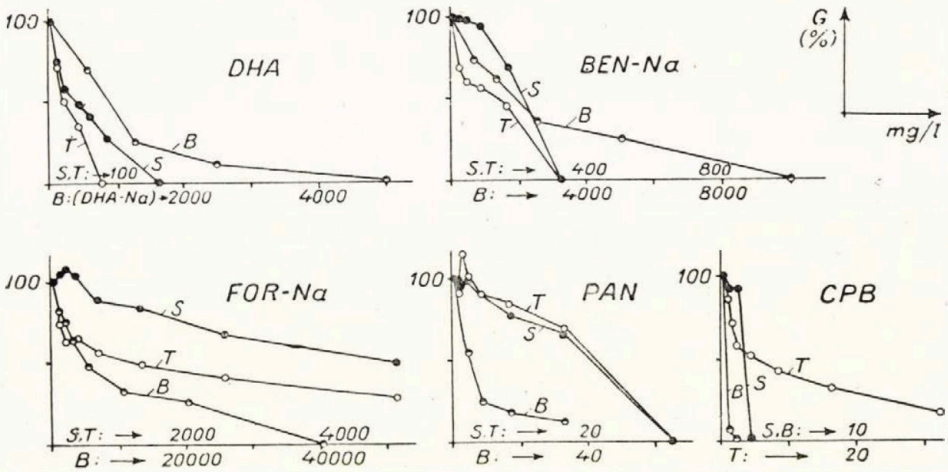


Fig. 4

Discussion

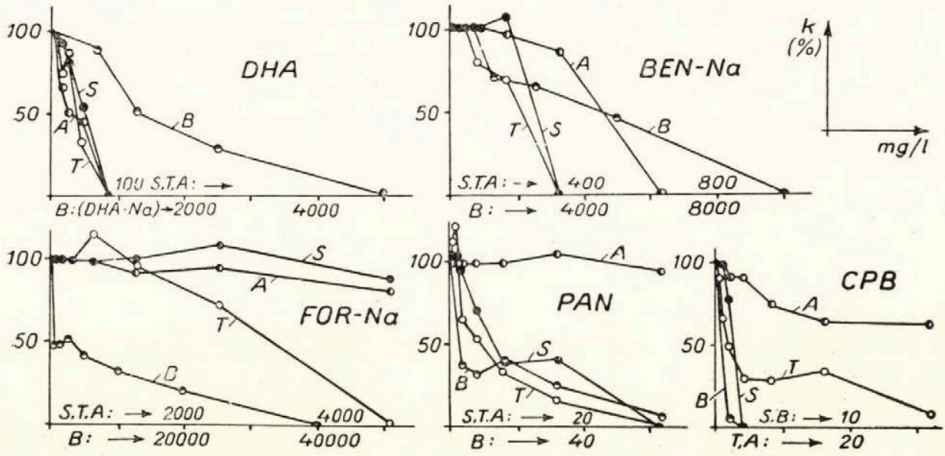
Relationship of growth rate constant and maximum population

As shown in Figs. 5 and 6, the maximum number of cells changed mostly parallel with the growth rate constant.



S : Saccharomyces, T : Torulopsis, B : Bacillus,

Fig. 5



S : Saccharomyces, T : Torulopsis, B : Bacillus, A : Aspergillus

Fig. 6

The only striking exception to this was Pandurol, as tested against *Saccharomyces* and *Torulopsis*, where G reacted slower than k when the concentration was increased. On the other hand, in the case of sodium formate k was reduced more slowly than G.

From data not to be given in detail we calculated for each of the chemical agents that concentration which would reduce the maximum population to its half (m_G). A comparison of the m_G values with the concentrations reducing the growth rate constant by 50 per cent (m) is given in Table IV.

Table IV

Chemical	Saccharomyces			Torulopsis			Bacillus		
	m	m_G	$\frac{m_G}{m}$	m	m_G	$\frac{m_G}{m}$	m	m_G	$\frac{m_G}{m}$
DHA*	35	32	0,9	30	21	0,7	1400	?	?
BEN-Na	240	170	0,7	160	91	0,6	3300	1700	0,5
FOR-Na	$\geqslant$5120	$>$5120	?	3000	1200	0,4	1700	4800	2,8
PAN	8,5	15	1,8	3,9	16	4,1	$<$4	$<$4	?
CPB.....	1,2	1,3	1,1	2	4	2,0	$<$4	$<$4	?

* In the case of Bacillus : DHA-Na.

As it is shown also by the data in Table IV, there is no good parallelism between m and m_G, but considering that the determination of G consists of a single measurement, it is easier to carry out this than to determine k. It would be worth while to set up a great number of experimental series to find out whether m_G could satisfactorily be used for characterising the chemical agents. There is, however, a practical difficulty, it being not easy to predict at what time G should be measured. Anyway, a single measurement will not reveal whether or not the culture is in the stationary phase of growth.

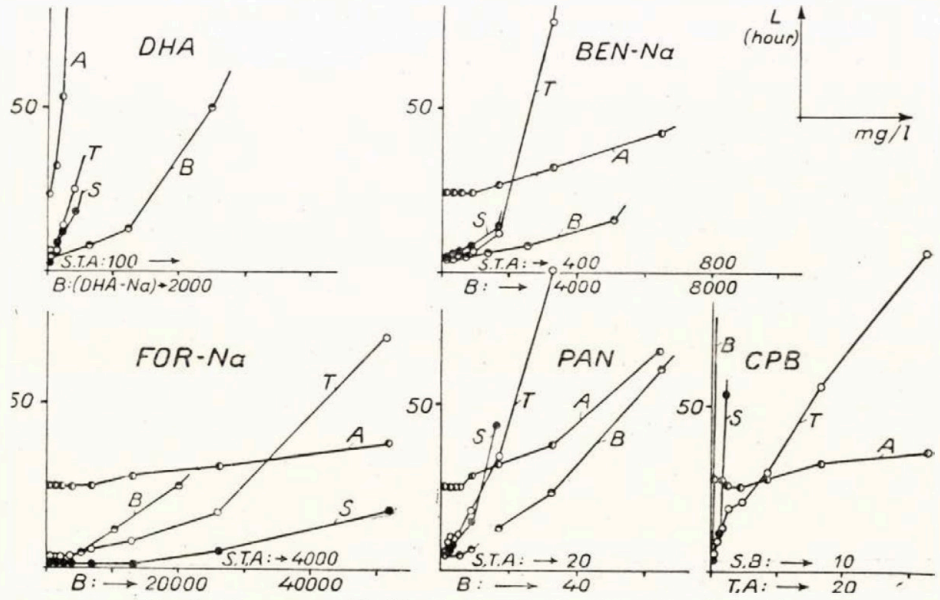
Relationship between growth rate constant and duration of lag phase

As regards the relation between lag phase and growth rate constant, no parallelism whatever could be found. The shape of the growth curves already reveals that there are chemical agents practically without influence on k when at the same time they bring about a marked prolongation of the lag phase. With other substances the opposite is the case. A comparative analysis of Figs. 6 and 7 is illustrative for this point.

With the use of dehydroacetic acid, for instance, there certainly is some parallelism between the prolongation of the lag phase and the decrease of the growth rate for each of the four microorganisms examined. On the other hand, Pandurol causes a marked prolongation of the lag phase of *Asp. foetidus*, while it exerts a very slight effect on the rate of growth. In contrast with this, the

lag phase of the latter organism is unaffected by cetyl pyridinium bromide, this compound being effective upon the growth rate only (see the corresponding curves in Fig. 3).

As the increase of L values usually does not mean the discontinuation of growth, only its prolongation, from the practical point of view the data of the lag phase are mostly less relevant than the growth rate constants. On the other hand, chemical agents acting only on the lag phase may also possess some practical value at concentrations prolonging the lag phase to such an extent that in the meantime the cells of the inoculum die off.



S : Saccharomyces, T : Torulopsis, B : Bacillus, A : Aspergillus

Fig. 7

A closer approach to the effect upon growth rate

According to the above, the medium effective dose appears to form a basis well enough suited for comparing the inhibitory effect of chemical agents. It is, however, doubtless that our knowledge of the nature of the effect of a chemical agent cannot be considered complete without knowing how it influences the lag phase, for instance. Moreover, the value of m by itself fails to represent unequivocally the inhibitory effect upon growth rate. The slopes of the moving average k : log concentration curves are variable and it may occur that two or more chemical agents exert the medium effect at the same concentration, while it is at entirely different concentrations that they bring about a reduction of, say, 80 per cent in the rate of growth.

So, for instance, the rate of growth of *Bacillus cereus* was reduced to 50 per cent by 1400 mg/l of sodium dehydroacetate and by 1700 mg/l of sodium formate, *i. e.* in this case the *m* values were close enough. On the other hand, the concentrations required for 80 per cent inhibition (D_{80}) were entirely different: of sodium dehydroacetate 3200 mg/l and of sodium formate 18000 mg/l were required; this means that when tested at that inhibition level, formic acid is about six times less effective than dehydroacetic acid (Fig. 8).

When characterising the effect of some chemical agent, it appears therefore expedient to state, in addition to the *m* values, also the slope of the moving average *k* : log concentration curve.

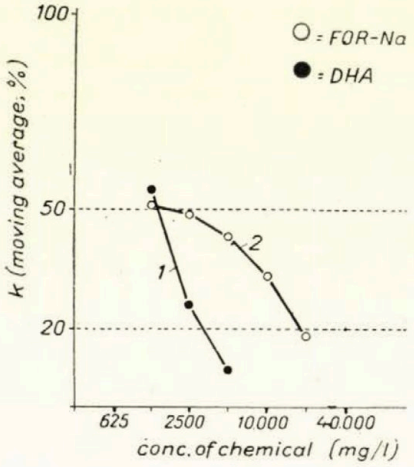


Fig. 8

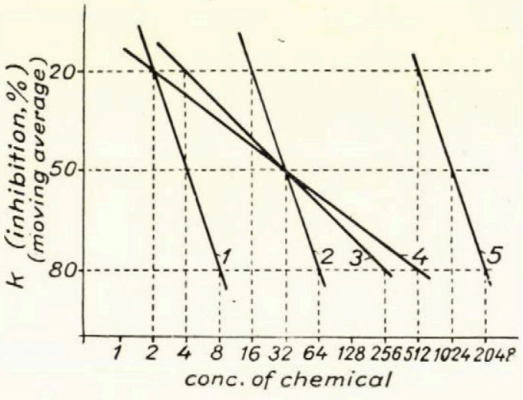


Fig. 9

In practice, a chemical agent is the more valuable the lower its *m* value and the greater its slope. For instance, in Fig. 9 from among the compounds yielding the curves 1, 2, and 5 (whose slopes are identical) 1. is the best, because its $m = 4$. Chemicals 2, 3 and 4 are equal in that each has an $m = 32$, but as the slope is the greatest with compound 2, this is much more effective than the other two are.

The slope of the (moving average *k* : log *D*) curve could be expressed *e. g.* — by the ratio

$$Q = \frac{D_{80}}{m} .$$

If, *e. g.* $m = 1024$ and $D_{80} = 2048$, then

$$Q = 2.$$

In our experiments the Q values obtained by calculating regression varied between 2 and 3. The only exception was the effect upon *Bacillus cereus* of sodium formate, where the value of Q was 13.

Growth rate constant and mechanism of inhibitory action

The relationship between concentration of the chemical agent and growth rate constant may reveal further details of the nature of the effect upon micro-organisms of certain chemicals.

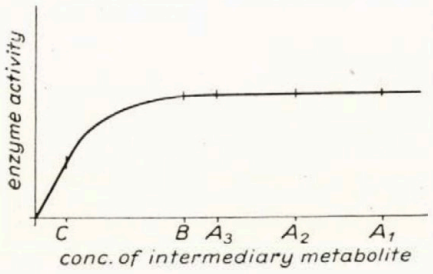


Fig. 10

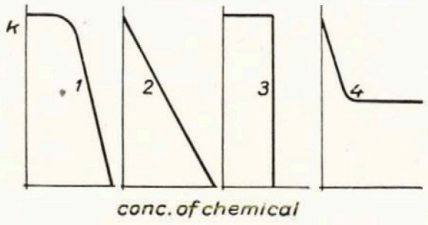


Fig. 11

Hinshelwood [4] has put forward the theory that often the inhibitory agent acts by inhibiting the cell to produce some vital intermediary metabolite in sufficient quantity. The enzyme system using this metabolite as substrate will be interfered with and consequently cellular function and multiplication are impaired. The relationship between concentration of intermediary metabolite and enzyme function (and, consequently, the growth of the microbe) is shown in Fig. 10. (After *Hinshelwood.)*

Under normal conditions, the concentration in the cell of the intermediary metabolite is around A_1, A_2, A_3. This, however, may be reduced by chemical agents. The metabolite concentration must sink below B to make the enzyme system lose some of its activity. This means that inhibition will take place above a certain concentration only, but then, between concentrations B and C, it will sharply increase. Curve 1 in Fig. 11 illustrates the relationship between inhibition and the concentration of the chemical agent *(Hinshelwood* [4]).

The same result is brought about if the chemical agent blocks, instead of the production of the intermediary metabolite, its adsorption onto the enzyme surface. This may occur when the structure of the chemical agent is similar to that of the metabolite and they compete for being adsorbed onto the enzyme surface («competitive inhibition»).

Such a «threshold» may be absent in some cases, as for instance in that shown in curve 2, Fig. 11, where the growth rate is inversely (linearly) related to the concentration of the chemical agent.

A third possibility is that the chemical agent acts exclusively on the duration of the lag phase. If the prolongation of the lag phase is sufficiently long it results in microbial death. Thus, the value of k will remain at the same level while the concentration of the chemical agent is raised. Above a certain concentration, however, growth will cease abruptly because the microbes die off (Curve 3, Fig. 11).

It may also occur that on increasing the concentration of the chemical the value of k, after an initial drop, will remain at the same level even if excessive doses are used (curve 4, Fig. 11). This may be explained in two ways: 1. the molecule of the chemical agent is too large for being adsorbed onto the surface of the enzyme, while smaller metabolite molecules will still find unoccupied surface areas, or 2. two alternative growth mechanisms exist, of which one is more liable to be influenced by the chemical agent than the other.

In the light of the above the relationship existing between rate of growth and concentration of the chemical agent will reveal much of what actually takes place during chemical action.

With respect to this the chemicals tested could be divided into various groups. For instance, there is apparently no threshold in the effect upon *Saccharomyces*, *Torulopsis* or *Aspergillus* of dehydroacetic acid (curve 2, Fig. 11). The same applies to its effect upon *Bacillus*.

Similar in type are the effects of formic acid and Pandurol upon the *Bacillus*, or that of cetyl pyridinium bromide upon *Bacillus* and *Torulopsis*, while sodium benzoate apparently acts by competitive inhibition. The same applies to sodium formate in the case of *Saccharomyces*, *Torulopsis* and *Aspergillus*, as well as to Pandurol in connection with *Aspergillus*, and to cetylpyridinium bromide in the case of *Torulopsis* and *Aspergillus*, although the latter three agents have been tested in concentrations not high enough to cause any serious inhibition of growth of some microbes.

Much will depend, of course, on how carefully the concentration of the chemical agent is being increased. If the first concentration tested is too high, a threshold at a lower concentration escapes attention. Consequently, the conclusions drawn from the above described examples cannot be considered final until substantiated in further, more precise experiments.

It is interesting that low concentrations of Pandurol exert a slight stimulatory effect on the growth of *Saccharomyces* and *Torulopsis*. This is subsequently followed by abrupt inhibition.

Another kind of kinetical examination of the mechanism of action is presented by the following experiment.

It is known from the work of *Seevers et al.* [11] that, of the numerous enzyme systems examined, in animal tissues only succinic dehydrogenase is appreciably affected by dehydroacetic acid. The cited authors measured the O_2 consumption of the succinic oxidase system at various concentrations of

dehydroacetic acid in a 0,1 M phosphate buffer of pH 7,4 and obtained the curve *A* shown in Fig. 12. It has been shown, in addition, that dehydroacetic acid had no effect upon the cytochrome — cytochrome oxidase system.

When the actual cause of the inhibition of microbial growth is a blocking of succinic dehydrogenase, the inhibition curve should run parallel with the above curve. As seen in Fig. 12, the curve showing the inhibition of *Bacillus cereus* (*B*) differs in slope from curve *A*, although both are in the same concentration range. Not even this is true with the curves for *Saccharomyces* (*C*) and *Aspergillus* (*D*). These organisms are namely inhibited by dehydroacetic acid in concentrations about 100 times lower. These facts appear to indicate that, at least in the case of *Saccharomyces* and *Aspergillus*, succinic dehydro-

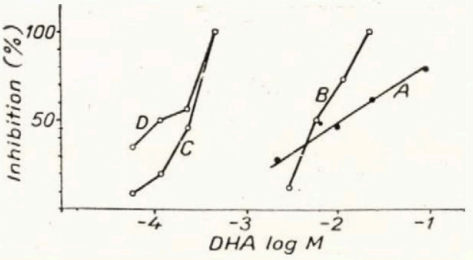


Fig. 12

genase is not involved in the mechanism of inhibition. It should, however, be borne in mind, that *Saccharomyces* and *Aspergillus* were tested at pH 4,75 and 4,25, respectively, while the enzyme was studied at pH 7,4. The pH of the medium used in the case of *Bacillus cereus* was 7,0. This may account for the similarity of the results and it is not unlikely that the inhibition of bacterial growth was in part due to an effect upon the succinic dehydrogenase of *Bacillus cereus*. As regards the other organisms, studies of the enzyme in lower pH ranges are required before definite conclusions can be drawn.

Evaluation of the chemical agents tested

When data on the inhibition of microbial growth are summarized and grouped according to chemical agents and organisms, it should be borne in mind that the effect of inhibitors of the weak acid type is usually bound to the non-dissociated acid molecule (*Rahn & Conn* [8], *Vas & Ingram* [15], *Schelhorn* [9]). Since in various pH ranges the percentage of the non-dissociated portion may show considerable variations, this fact should always be taken into account when making comparisons and the concentration data should be expressed in terms of the actually effective portion. In this way is obtained

the so-called «absolute efficacy» *(Schelhorn* [10]). From this, in knowledge of the actual pH and the dissociation constant of the substance in question, it becomes possible to compute its amount actually required.

In Table V are shown the medium effective doses of weak acids and their values for «complete» inhibition, calculated for total acid and for the non-dissociated part of the compound.

Table V

Organism	Initial cell count (cells/ml)	pH	Dose of chemical required (mg/l)									
			computed for acid in the case of weak acids					computed for non-dissociated compound				
			DHA	BEN	FOR	PAN	CPB	DHA	BEN	FOR	PAN	CPB
Bacillus cereus	$5{,}4 \cdot 10^5$	7,00	*1100* 4000	*2800* 8500	*1100* 27000	*<4* 256	*<4* 8	*21* 75	*4* 13	*0,6* 15	*<4* 256	*<4* 8
Sacch. cerevisiae	$1{,}8 \cdot 10^5$	4,75	*35* 80	*200* 270	*⩾3460* ⩾3460	*8,5* 32	*1,2* 2	*27* 62	*42* 57	*⩾320* ⩾320	*8,5* 32	*1,2* 2
Torul. utilis	$3{,}3 \cdot 10^5$	4,75	*30* 80	*140* 540	*2000* >3460	*3,9* 32	*2* >32	*23* 62	*30* 114	*180* >320	*3,9* 32	*2* >32
Asp. oet idus	—	4,25	*22* 80	*340* 1100	*⩾3460* ⩾3460	*⩾32* ⩾32	*>32* ⩾32	*20* 73	*160* 500	*⩾830* ⩾830	*⩾32* ⩾32	*>32* ⩾32

Figures in italics: 50% growth rate inhibition.
Standing figures: «complete» inhibition.

The data in Table V only serve to illustrate the method used in evaluating the inhibitory effect. The final order of the substances tested cannot be determined before further experiments had been carried out and evaluated statistically.

In the experiments described in the present paper inhibitory effects were examined. The same methods naturally lend themselves for studying effects *promoting* growth. The concentrations required for attaining a certain degree of stimulation may be computed by means of the methods described. For that purpose, too, the slope of the moving average dose-response curve serves as a valuable basis for evaluating different compounds.

Summary

Kinetic measurement of cell growth may be successfully employed for elucidating qualitative and quantitative relations of the effects promoting or inhibiting microbial growth. Analysis of the growth curves yielded by bacteria, yeasts or moulds in the presence of various concentrations of a chemical agent,

quantitative evaluation of the lag phase, exponential growth rate constant and total growth disclose data allowing a quantitative comparison of the effects of various substances and at the same time insight may be gained into their mechanism of action.

A new method has been worked out for determining the medium effective dose and for a closer characterisation of the effect upon the rate of growth.

*

In conclusion the author expresses his thanks to Mrs. *P. Nyerges* of the Ampelological Research Station for the strains of *Saccharomyces* and *Aspergillus* used in this work.

LITERATURE

1. *Barbour, R. G. H., Vincent, J. M.:* J. Gen. Microb. **4,** 110 (1950).
2. *Cavill, G. W. K., Phillips, J. N., Vincent, J. M.:* J. Soc. Chem. Ind. **68,** 12 (1949).
3. *Cavill, G. W. K., Vincent, J. M.:* J. Soc. Chem. Ind. **68,** 189 (1949).
4. *Hinshelwood, C. N.:* The Chemical Kinetics of the Bacterial Cell, Clarendon Press, Oxford (1946).
5. *Monod, J.:* Recherches sur la croissance des cultures bactériennes. Hermann, Paris (1942).
6. *Murrell, W. G., Vincent, J. M.:* J. Soc. Chem. Ind. **69,** 109 (1950).
7. *Osgood, E. E., Gamble, B.:* J. Lab. & Clin. Med. **32,** 444 (1947).
8. *Rahn, O., Conn, J. E.:* Ind. Eng. Chem. **36,** 185 (1944).
9. *Schelhorn, M. von:* Ztschr. Lebensm.-Unters u.-Forsch. **92,** 256 (1951).
10. *Schelhorn, M. von:* Food Techn. **7,** 97 (1953).
11. *Seevers, M. G., Shideman, F. E., Woods, L. A., Weeks, J. R., Kruse, W. T.:* J. Pharm. & Exp. Therap. **99,** 69 (1950).
12. *Thompson, W. R.:* Bact. Revs. **11,** 115 (1947).
13. *Tomkins, R. G.:* Transactions Brit. Mycol. Soc. **17,** 150 (1932).
14. *Vas, K.:* Acta Microbiol. Hung., **2,** 203 (1955)
15. *Vas, K., Ingram, M.:* Food Manuf. **24,** 414 (1949).

ИЗУЧЕНИЕ КИНЕТИКИ ФАКТОРОВ, ВЛИЯЮЩИХ НА РАЗМНОЖЕНИЕ МИКРОБНЫХ КЛЕТОК

К. Ваш

Резюме

Для изучения качественных и количественных условий воздействий, способствующих размножению микроорганизмов, или тормозящих их размножение, могут с успехом применяться кинетические измерения размножения микробных клеток.

Вышеупомянутые воздействия нарушают обычный процесс размножения микробных культур.

В своих опытах автор турбидиметрическим методом (14) изучал размножение культур *Sacch. cerevisiae* var. *ellipsoideus*, *Torulopsis utilis* var. *maior* и *Bacillus Ceresus* (с известным исходным числом микробов) в средах, содержащих различные концентрации химикатов. Графически определили длительность ляг-фазы (*L*), из экспоненциальных фаз — генерационное время *(T)*, и из последнего — константы скорости размножения [*к*/час$^{-1}$]. Наконец, измеряли установившиеся спустя долгое время максимальные числа микробов *(G)*. — У плесеней *(Asp. foetidus)* в чашках Петри измеряли ляг-фазу *(L)* и скорость [*к*/мм/час] выявляющегося на агаре бокового распространения

С целью охарактеризования воздействия, оказываемого на скорость размножения, для всех химикатов давалась такая концентрация, которая снижала точно на 50% значение κ, т. е. константу средней скорости размножения контрольных культур, не содержащих химикатов (m = доза средней эффективности). Для вычисления этого автор применял известный из статистики метод подвижных средних и графическую или расчетную интерполяцию [Томпсон (12)]. Для более близкого охарактеризования воздействия, оказываемого на κ, дается какая-либо цифра, выражающая угол падения кривой дозы-воздействия, так, например, частное (Q) дозы вызывающей 80%-ое торможение ($D80$) и дозы среднеи эффективности ($m = D50$).

Подобные исследования кинетики размножения дают представление о механизме воздействия химикатов.

HEAT DESTRUCTION OF BACTERIAL SPORES IN THE PRESENCE OF CHEMICAL AGENTS

By

K. VAS and G. PROSZT

Institute for Research in Canning, Meat Packing and Refrigeration

(Received April 27, 1954)

Extensive studies have been concerned with factors capable of accelerating the rate of destruction by heat of microorganisms. Reduction of pH, the presence of certain compounds and several other factors have been shown to possess such an effect. More recently, *Andersen* and *Michener* [1] have reported upon experiments in which vegetables were treated with antibiotics and found subtilin to be particularly effective. These authors showed that tinned asparagus inoculated with *Bacillus stearothermophilus* could be sterilised by boiling for 20 minutes in the presence of 5 mg/kg of subtilin and in 10 to 20 minutes at a subtilin concentration of 10 or 20 mg/kg. The cans tested were about 1/3 kg in capacity. This report has stimulated a series of experiments along the same lines. In addition to subtilin, most of the commonly used antibiotics have been tested for that effect. Later experiments, however, confirmed the first reports only in part [1, 3, 8] and many authors have contradicted the findings of Andersen and Michener [13]. These experiments have nevertheless focussed interest anew upon the problem of combining heat treatment with chemical agents.

Experimental

Considering that the problem is of extreme practical and general microbiological importance, it appeared interesting to study in detail the procedures involving a combination of heat and chemical treatment for the purpose of preservation.

The first question to be clarified was whether the preservative effect reported in the literature to result from a combination of mild heating and chemical treatment would be due to a decrease of microbial heat resistance or to inhibition of growth induced by the chemical agent used.

Part I.

Effect of chemical agents upon microbial heat resistance

In the first part of the experiments reported in the present paper, the effect upon microbial heat tolerance of some commonly used chemical agents was examined. Heat resistance was tested by well-known methods [9, 10, 11], with some modifications to meet special requirements.

Material and methods

Microorganism

A spore suspension from a culture of *Bacillus cereus* (strain 54) was used. The strain was isolated by plating out several times a microbial suspension prepared from a mixed culture from frozen green peas by heating at 90° C for 10 minutes. The strain was grown in Petri dishes, on the surface of agar containing green pea extract and buffer.

The culture medium was prepared in the following way. 100 g quick-frozen green peas were finely ground, extracted with 900 ml of cold distilled water and centrifuged. To 200 ml of the pure extract were added 500 ml *M*/15 phosphate buffer (of pH = 7, or in certain experiments of pH = 6, as determined by a glass electrode), 0,4 per cent peptone (WITTE), 0,2 per cent sucrose and 2 per cent agar. The mixture was made up to 1000 ml with distilled water.

The ratio of vegetative and sporing forms was determined from time to time by phase-contrast microscopy and at the time most of the cells were in the spore state the culture was suspended in a sterile buffer solution (pH 7), thoroughly shaken, filtered through a *G*-1 Jena sintered glass filter to eliminate eventual clumps, and stored in a refrigerator, at approximately +8° C.

The suspension was sampled from time to time and tested for heat tolerance in order to detect eventual changes in its properties.

The number of viable cells in the suspension was approximately 10^9, as determined by the dilution method (see below) and by microscopic counting.

Microbial count

This was determined by the dilution method. In the sequence of the exponents of 10, dilutions were made in sterile water. Three times or five times 1 ml of each dilution were transferred onto agar medium sloped in test tubes containing 10 ml of agar each. The tubes showing presence or absence of growth (positive and negative tubes) were counted after 10 days of incubation at +28° C and, the most probable number of viable cells was calculated on the basis of the probability tables of *Hoskins* [5].

Heat treatment

The bath used for heat treatment

A glycerol bath, with a temperature varying within the limits of ±0,25° C, was used. In a 10 litre container holding 6 to 7 litres of glycerol were submerged an electrically controlled thermo-coil, an electric stirrer (approximately 400 r.p.m.) and a thermometer with a 0,1° C scale [12]. Also submerged in the glycerol was a rack for the test tubes. Care was taken that the level of the fluid in the test tubes be far below the level of the glycerol (a weight was placed on the tubes).

Procedure

Prior to heat treatment, the stock suspension of the microbe was diluted with liquid green pea extract medium, the composition of which was as described above except that it did not contain agar. The chemical agents were added to the suspensions which were then exposed to heat. A number of preliminary experiments were made to find the most adequate method of heat treatment. Two main principles were kept in mind, *viz.* (i) the volume of the samples must be low and they should be kept in tubes small in diameter in order to increase the rate of heat penetration, and (ii) with heat treatment in the presence of a chemical agent the samples should be diluted, immediately after heating, to that concentration of the chemical substance which at the incubation temperature does not seriously inhibit microbial growth. This is necessary in order to establish whether the chemical agent acted directly on the rate of heat destruction. If point (ii) is not given due attention, the special effect increasing the rate of heat destruction cannot be distinguished from the general growth-inhibitory effect of the substance. The concentrations of the chemical agent were so chosen that a dilution of about 1 to 20 should abolish the growth inhibiting effect of the preservatives.

After a number of unsuccessful preliminary experiments the following method proved to be the most satisfactory. By means of a 1 ml sterile pipette 0,75 ml of the bacterial suspension was measured into each 16×160 mm normal sterile test tube. The tubes were then heated in the above described apparatus for pre-determined lengths of time. On removal from the apparatus the tubes were cooled by submersion in water and into each tube 15 ml of a pH 7 sterile green pea extract medium were added. Experience has shown that by doing this carefully, it was possible to avoid contamination of the upper inside surface of the test tube during pipetting. The 0,75 ml volumes warmed up so rapidly that under the given conditions this did not represent any source of error with the heating times usually employed. The positivity or negativity of the tubes was judged after 10 days of incubation at 28° C.

Calculation of heat destruction data

The heat tolerance of the spores was expressed by the so-called *decimal reduction time* [7], *i. e.* by the time required for reducing the number of viable cells in the heat-treated suspension to one-tenth of the initial count. Decimal reduction time was determined by two methods.

Plotting of the heat destruction curve by counting the microbes

This method consists of the following steps. During heat treatment the suspension is sampled from time to time and the number of viable organisms in each sample is determined by the dilution method. The logarithms of microbial counts obtained at equal (A-minute) intervals are approximated by a straight line calculated on the basis of the principle of least squares and making use of orthogonal moments. In this way both the equation for the straight line and the decimal reduction time are obtained (*Jordan* [6]). The standard deviation σ may also be computed.

It can be deducted that the equation of the straight line is represented by the formula

$$Y = \Theta_0 - \frac{3(S-1)}{S+1}\ \Theta_1 + \frac{6}{S+1}\cdot\Theta_1 \cdot t$$

where

Y is the logarithm of the number of viable cells at time t
t is the time in A-minute units
S is the number of observations
Θ_0 is the 0.-grade orthogonal moment
Θ_1 is the 1.-grade orthogonal moment

Decimal reduction time (in minutes) and the standard deviation may be expressed by the formulae

$$D = -\frac{S+1}{6\Theta_1}\cdot A,$$

and

$$\sigma^2 = \frac{1}{S}\,\Sigma\, Y^2 - \Theta_0{}^2 - \frac{3(S-1)}{S+1}\,\Theta_1{}^2\ .$$

The orthogonal moments may be computed from a table composed of observation data for equal (A-minute) intervals.

Calculation of decimal reduction time from »majority destruction« time

Decimal reduction time may be assessed also by means of determining the time required to kill off the majority of organisms («majority destruction» time). Pre-supposing that the heat destruction curve is logarithmic in nature, we determine the time at which the number of viable cells in a heat-treated suspension is reduced to around 1 per g or per ml. Having determined this latter value by probability considerations, decimal reduction time can be estimated.

The series to be heated are arranged so that at any predetermined moment 5 tubes are taken out of the bath. Microbial count (x) is assessed on the basis of *Halvorson* and *Ziegler*'s formula [4], from the number of positive and negative tubes.

$$x = \frac{2{,}3}{a}\ \log\ \frac{n}{s}\ ,$$

where

a is the volume of a single sample
n is the total number of tubes taken out at a given point of time (number of replications)
s is the number of negative tubes at the above moment.

Knowing the initial cell count (N) and the number (x) of cells still viable after a certain period of heat treatment, the duration of heat treatment (U) divided by the difference of the logarithms of the two cell counts gives directly the decimal reduction time (D):

$$D = \frac{U}{\log N - \log x}.$$

The difficulty inherent to this method is — as it has been pointed out in the literature, too *(e.g.* [11]) — that after the time when the number of the positive tubes first drops below 5 there will usually be more than one point of time at which the number of positive tubes is relatively high. As a result, not infrequently, *more than one* decimal reduction time will be obtained within a single experiment, complicating evaluation. *Stumbo* [11] suggests that the mean of these decimal reduction times which we will call «averaged D» should be taken as the D value for a given experiment. We do not think this to be entirely free from objection on the basis of the following considerations.

It is known that with various microbes destruction due to exposure to external effects, physical or chemical, is in logarithmic relation to time. This law is, however, valid above a certain number of microbes only ; after a considerable number of the organisms had been killed, even prolonged heating will fail to induce marked destruction. This phenomenon occurs with pure cultures too, and is as yet unexplained. It may be assumed that these surviving cells are responsible for the fact that more than one D value can be obtained within the same experiment. And if this is actually the case, we shall obtain a more proper picture of the culture as a whole by disregarding these cells and by focussing attention upon the destruction of the majority of microbes. It appears therefore justified to suggest that the value of D should be based on that point of time at which the first negative tube is found among the five parallels taken out simultaneously. — With the opposite procedure, the averaged D will much too often depend upon the duration of the experiment : not infrequently positive tubes will occur even after the final period of heating. Further experiments are being planned to elucidate which of the two D values is more adequate from the point of view of industrial practice.

Chemicals

Dehydroacetic acid *(DHA)*, laevulinic acid *(LEV)*, *p*-hydroxibenzoic acid methyester *(PBM)*, KNO_2, cetylpyridinium bromide *(CPB)*, penicillin *(PEN)*, streptomycin *(STR)* chloromycetin *(CHM)*, aureomycin *(AUR)*, as well as an antibiotic isolated at the Ampelological Institute, Budapest from a strain of Aspergillus *(A)* were used in the experiments.

Experimental results

Determination of the shape of the destruction curve

Microbial counts were made from time to time during heating in order to find out whether the destruction curve was actually logarithmic in nature (Table I). In Fig. 1 is shown the destruction curve for the spore suspension in a pH 7 buffer, at 90° C, without any chemical agent. Fig. 2 shows the curve obtained in the presence of 10 mg/lit. cetylpyridinium bromide, and Fig. 3 shows the curve resulting in the presence of 10 mg/lit. chloromycetin. As it can be noted, in each case — using the orthogonal moments — the experimental points could well be approximated by a straight line. The correlation was close, the correlation coefficient (r) being $-0{,}978$ for Fig. 1, $-0{,}964$ for Fig. 2 and $-0{,}987$ for Fig. 3. The significance of r values was $>99{,}9\%$ in each case. The deviation of the two extreme r values was not significant ($P = 0{,}16$).

Table I

Duration of heat treatment (minutes) at 90° C, in a phosphate buffer pH 7,0	Number of viable cells per ml		
	in medium free from chemical agents	in the presence of 10 mg/l of cetylpyridinium bromide	in the presence of 10 mg/l of chloromycetin
0	$1{,}1 \cdot 10^7$	$4{,}9 \cdot 10^7$	$7{,}9 \cdot 10^7$
15	$1{,}5 \cdot 10^5$	$1{,}5 \cdot 10^5$	$4{,}3 \cdot 10^5$
30	$4{,}3 \cdot 10^4$	$4{,}3 \cdot 10^3$	$4{,}3 \cdot 10^4$
45	$9{,}3 \cdot 10^3$	$2{,}1 \cdot 10^3$	$4{,}3 \cdot 10^3$
60	$2{,}9 \cdot 10^1$	$9{,}3 \cdot 10^2$	$4{,}3 \cdot 10^2$
75	$4{,}3 \cdot 10^1$	$4{,}3 \cdot 10^0$	$1{,}5 \cdot 10^1$
90	$2{,}3 \cdot 10^0$	$2{,}3 \cdot 10^0$	$4{,}3 \cdot 10^0$

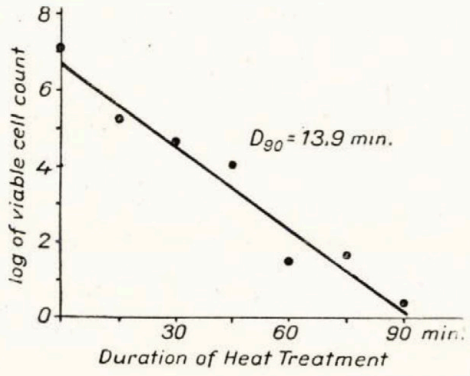


Fig. 1

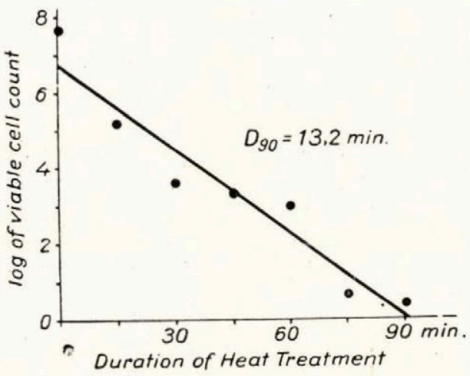


Fig. 2

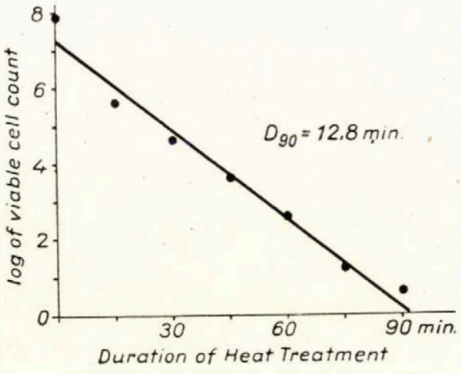


Fig. 3

According to the above it seemed justified to use the measurement of the «majority destruction» time for calculating the decimal reduction time, both in the presence and absence of a chemical agent.

Determination of the temperature coefficient and of the temperature characteristic

The heat tolerance of spores changes with temperature. This is an important property of microorganisms. In our work, the knowledge of this relationship was of especial importance for comparing the order of magnitude of chemical and thermal effects. The decimal reduction times were computed from the data of majority destruction times at various temperatures and from the values obtained (Table II, Fig. 4), the correlation between temperature and destruction

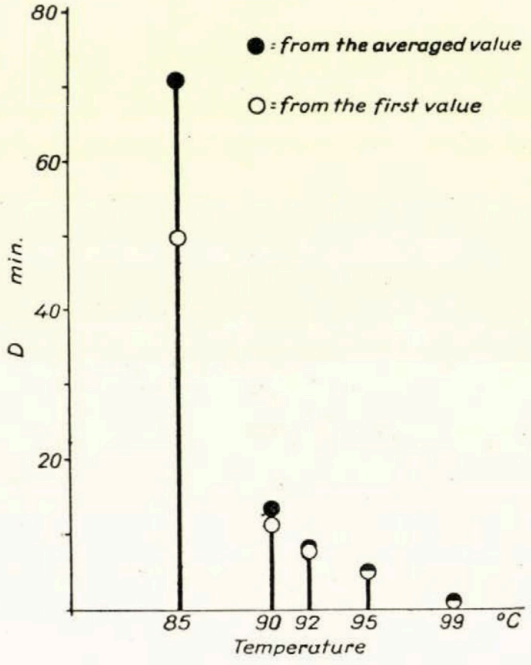


Fig. 4

time was computed, applying the principle of least squares, by solving the equations

$$aN + b \cdot \sum X - \sum Y = 0,$$

and

$$a \sum X + b \cdot \sum X^2 - \sum XY = 0,$$

where N is the number of experimental data
Y is the *log* D value at a given experimental temperature X
a is the constant determining the position and
b the constant determining the slope of the line: $Y = a + b \cdot X$.

The results are illustrated in Fig. 5. With D values computed on the basis of the first negative tubes (Fig. 5, curve I), $a = 11{,}596$, $b = -0{,}1165$. With the averaged D values (curve II), $a = 12{,}754$, $b = -0{,}1284$.

Table II

Temperature of heat treatment (°C)	Decimal reduction time (D), in minutes	
	calculated from the appearance of the first negative tubes	averaged values
85	49,30	70,60
90	11,04	13,81
92	7,76	8,16
95	4,93	5,14
99	0,94	0,94

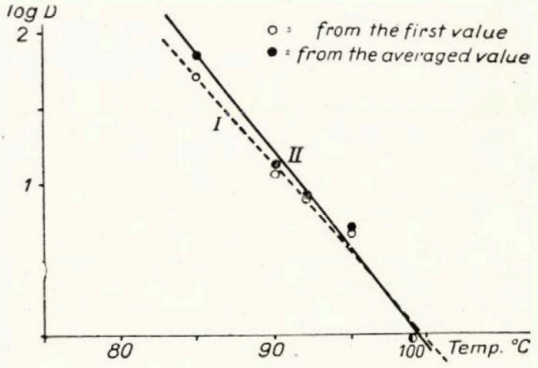


Fig. 5

It can be noted that a temperature increase of 10° C reduces the *log D* value computed from the time at which the first negative tubes had occurred by (10 × 0,1165 =) 1,165, so that the decimal reduction time is reduced (num. log. 1,165 =) 14,6 times. In other words, the temperature coefficient of heat destruction is $Q_{10} = 14{,}6$. The temperature characteristic of heat destruction (μ) is computed from the equation,

$$k_2 = k_1 \cdot e^{\frac{\mu}{2}\left(\frac{1}{T_1}-\frac{1}{T_2}\right)},$$

where k_1 and k_2 are the destruction rate constants at the absolute temperatures T_1 and T_2, respectively. Considering that $\frac{k_2}{k_1} = \frac{D_1}{D_2}$ and working with the

data for 80° and 100° C it is found that, computed from the first negative tubes,

$$\log D_{80} = 11{,}596 - 0{,}1165 \cdot 80 = 2{,}276$$

and

$$\log D_{100} = 11{,}596 - 0{,}1165 \cdot 100 = -0{,}054.$$

The value of the temperature characteristic is

$$\mu = 4{,}6 \frac{(\log D_1 - \log D_2)\, T_1 \cdot T_2}{T_2 - T_1} =$$

$$= 4{,}6 \frac{(2{,}276 + 0{,}054)\, 353 \cdot 373}{20}$$

$$\mu = 70600,$$

which is a high value, identical in order of magnitude with the activation energy of protein coagulation. Computed by the same method from the averaged D, $Q_{10} = 19{,}2$, $\mu = 77900$.

The Q_{10} values derived from the two series of data do not differ significantly.

Knowledge of these values is of practical importance, too, as the primary aim of our investigations was to bring about an increase in the rate of heat destruction by using chemical agents, or, in other words, to use some chemical agent or agents instead of raising the temperature. This means at the same time that, in practice, only such chemicals deserve attention which — even in low concentrations — are capable to substitute rises of temperature of 10 to 20° C, *i. e.* such as will shorten the decimal reduction time to 1/15 or 1/220 its original value.

Heat destruction of bacterial spores in the presence of chemical agents

Experiments at pH 7

First of all the decimal reduction time was determined repeatedly *without a chemical* agent at 90° C. (In the following, the experiments are to be understood to have been conducted at 90° C, unless otherwise stated.) The results of experiments carried out on different days are shown in Fig. 6. The values vary markedly, but without a definite trend. Of course, the D values calculated from the time of appearance of the first negative tubes are usually lower than those calculated from the averaged D, the means being: from the first negatives: 11,05 minutes, from the averaged D: 13,81 minutes. The difference is significant ($t = 2{,}62$, degrees of freedom: 14; $P = 0{,}02$).

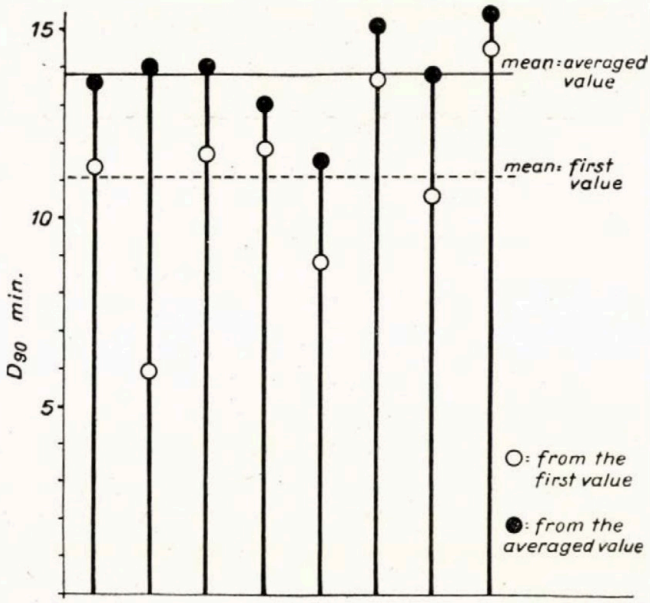

15
10
5
D_{90} min.
mean: averaged value
mean: first value
○: from the first value
●: from the averaged value

Fig. 6

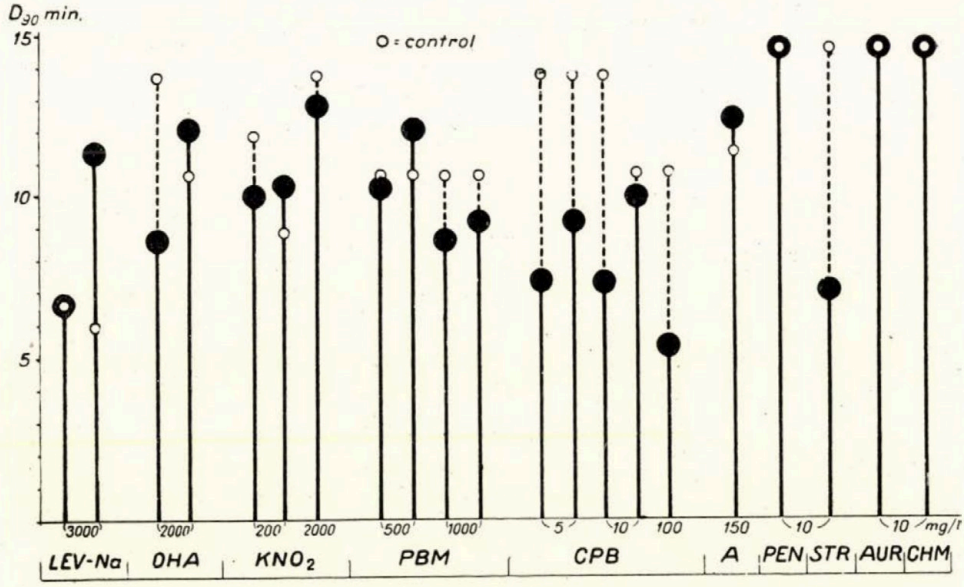

D_{90} min.
15
10
5
○ = control
3000
2000
200
2000
500
1000
5
10
100
150
10
10
mg/l
LEV-Na
OHA
KNO_2
PBM
CPB
A
PEN
STR
AUR
CHM

Fig. 7

In Fig. 7 are shown the decimal reduction times, as determined from the first negative data, in a phosphate buffer of pH = 7, at 90° C, and *in the presence of* various chemical agents. It can be noted that in many a case the *D* values obtained with chemical agents are lower than those of the control, but this is not invariably so. Even where this appears to be a regular feature (in the presence of CPB), the mean decimal reduction times obtained with the chemical agent (ignoring the concentration of CPB) is only 1,6 times shorter than that for the control. Since log $Q_{10} = 1{,}165$ corresponds to a 10° C rise in temperature, log 1,6 = 0,204 must correspond to $\frac{0{,}204 \times 10}{1{,}165} = 1{,}75°$ C. Thus, CPB is capable of substituting an increase in temperature of only 1,8° C, which is not a serious advantage from the point of view of commercial sterilisation.

Experiments at pH $\leq$ 6

Being aware of the fact that pH 7 creates the most unfavourable basis for the action of the chemical agents tested — owing, first of all, to a strong

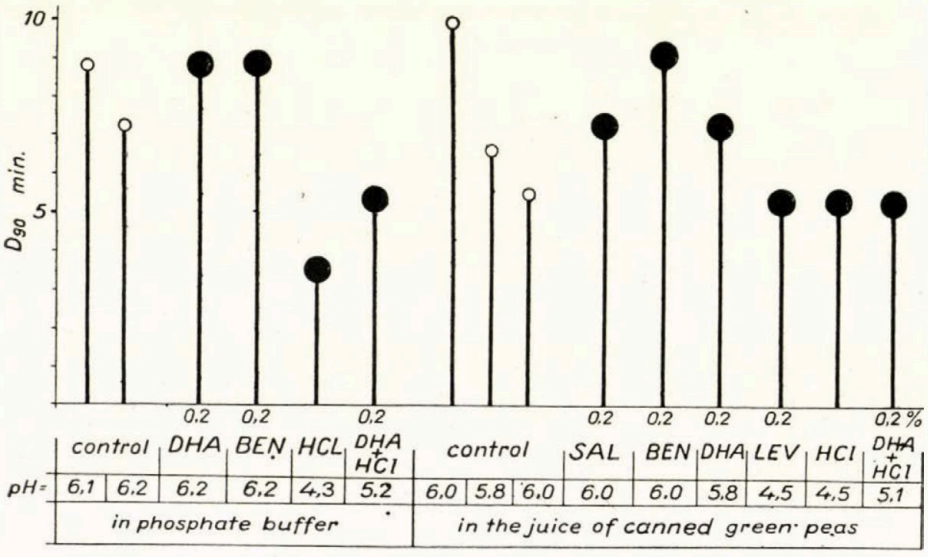


Fig. 8

dissociation of weakly acid substances, — attempts were made to reproduce the experiments at lower pH values. Two media were given a trial in this work. One of them was the buffered green pea extract which was more acid, but othervise identical with the one described, the other was a filtered juice of

a commercial brand of tinned green peas. (NaCl: 1,05%, refr. 4,9 to 5,1.) Originally, both had a pH around 6, but the addition of certain substances caused a marked deviation from this pH value. The experimental procedure was identical with that used in the other experiments, even the filling-up after heat treatment was made with the buffered pH 7 medium (Fig. 8). The insufficient number of decimal reduction times for 90° C does not yet permit us to draw any definite conclusions. Nevertheless, the values appear to indicate that the chemical agents were not more effective at pH 6 than at pH 7. In any case, reduction of the pH to 6 does by itself cause some increase in the rate of microbial destruction and this will be even more apparent in the range around pH 4,5 (Table III).

Table III

No. of experiments	D_{90} values for different pHs		
	pH 7	pH6	pH 5,4
1	11,30	8,80	3,53
2	5,93	9,90	3,53
3	11,70	6,60	5,30
4	11,85	7,26	5,30
5	8,80	5,45	—
6	13,70	—	—
7	10,60	—	—
8	14,50	—	—
Mean:	11,05	7,60	4,42

Analysis of Variance

	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean squares	F	$F_{0,05}$	$F_{0,01}$	$F_{0,001}$
Total	189,81	16					11,8
Between pH groups	122,69	2	61,34	12,8***			
Within pH groups	67,13	14	4,80				
Between pH 7 and pH 6	36,53	1	36,53	7,6*	4,6	8,9	
Between pH 6 and pH 4,5	22,57	1	22,57	4,7*	4,6	8,9	
Between pH 7 and pH 4,5	117,31	1	117,31	24,5***		8,9	1,71

It can be noted that between pH 7 and 6, as well as between pH 6 and 4,5 the difference is significant, that between pH 7 and 4,5 being very highly so.

It is obvious that the effect of pH should be subjected to further detailed studies.

* = significant difference
*** = very highly significant difference

Part II.

The effect chemical agents upon the efficacy of heat treatment

In the second part of the investigations we examined whether, irrespective of a potential effect upon heat destruction, heat treatment combined with the administration of some chemical agent was, from the practical point of view, superior to simple heat treatment.

Material and methods

The method used was similar to what has been described for the previous series, except that after heat treatment chemical action was not suspended by dilution, so that the growth-inhibiting effect of the chemical agent was left to persist.

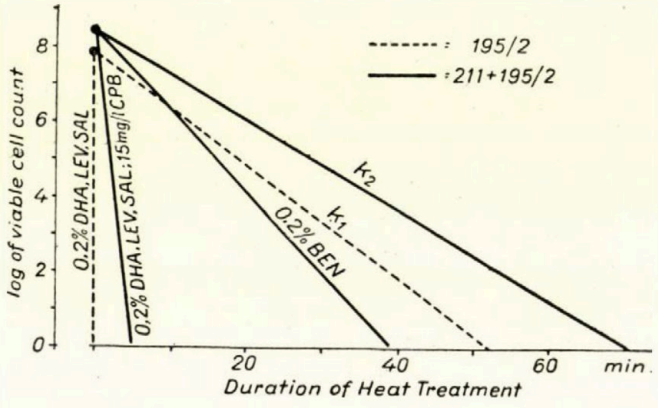


Fig. 9

Microorganisms tested

The microorganisms tested were : strain 195/2 of *Bacillus cereus* (from the culture used in the first part of the experiments), as well as a mixture composed of this strain and a mixed culture (No. 211) grown from decayed, frozen and thawed peas. This mixed strain was less heat-resistant and consisted mainly of lactic acid bacteria (bacilli and cocci) and of a small number of sporogenic anaerobic bacteria.

Heat treatment

The filtered juice of tinned green peas (pH = 5,8 to 6,0, sodium chloride : 1,0 to 1,2 per cent) was distributed into test tubes in 2 ml portions and sterilised. The chemical agents were added to reach the adequate concentration then the tubes were inoculated with the test microbes, to reach an initial count of about 10^8 per ml of suspension. Subsequently the tubes were exposed to 90° C by submerging in the glycerol bath. Five tubes were taken out at a time, rapidly cooled, placed immediately into an incubator and kept there at 28° C for 10 days.

Chemical agents tested

The following chemical agents were tested : dehydroacetic acid *(DHA)*, laevulinic acid *(LEV)*, sodium salicylate *(SAL)*, sodium benzoate *(BEN)*, cetylpyridinium bromide *(CPB)*.

Results

The results of the experiments may be summarized as follows (Fig. 9).

Experiments with pure bacterial cultures

It can be noted that the chemical-free control suspension (k_1) of the spore of the pure culture of *Bacillus cereus* (195/2) required 53-minute heat treatment for the microbial count being reduced to around 10^0. At the same time the samples exhibited no growth in the presence of 0,2 per cent dehydroacetic acid, 0,2 per cent laevulinic acid and 0,2 per cent sodium salicylate, respectively, even without heat treatment.

Experiments with mixed bacterial cultures

The suspensions consisting of a mixture of strains 195/2 and 211 required less than 10 minutes of heat treatment in the presence of 0,2 per cent dehydroacetic acid, 0,2 per cent laevulinic acid and 0,2 per cent sodium salicylate, respectively, in contrast with the chemical-free control (k_2), which required a 70-minute exposure to heat. In the presence of 0,2 per cent benzoate, destruction time was reduced to 40 minutes only.

Discussion and summary

A comparison of parts I and II of the experimental investigations described permits the following conclusions to be drawn. The chemical agents tested did not appreciably accelerate the rate of destruction by heat of the spores of the aerobic bacterial strain *(Bacillus cereus)* most often used. This is valid for media of pH 7, and most probably for lower pH values (6 or less) as well. Further data should, however, be accumulated and evaluated statistically before anything final can be stated in this respect. Especially the antibiotics should be subjected to more extensive testing.

If chemical action was not limited to the period of heat treatment, but was allowed to persist after heating, several compounds proved to increase the efficacy of heat treatment.

Combined treatment applied to mixed cultures obviously inhibits germination occurring after heating of heat-resistant spores while organisms not resistant are killed by heat. It is also possible that heat treatment as a sublethal effect brought about germination of spores so that subsequently the chemical agents acted not on the spores but on the vegetative forms.

In media free from chemical agents changes in pH had a marked effect upon the heat tolerance of microbes.

It appears desirable that further, more potent compounds should be tested, according to the criteria described.

LITERATURE

1. *Adams, A. T., Ayres, J. C., Tischer, R. G.* and *Ostle, B.:* Food Techn. **6,** 421 (1952)
2. *Andersen, A. A.* and *Michener, H. D.:* Food Techn. **4,** 188 (1950).
3. *Cameron, E. J.* and *Bohrer, C. W.:* Food Techn. **5,** 349 (1951).
4. *Halvorson, H. O.* and *Ziegler, N. R.:* J. Bact. **25,** 101 (1932).
5. *Hoskins, J. K.:* Public Health Repts. **49,** 393 (1934).
6. *Jordan, Ch.:* A Magyar Statisztikai Szemle Kiadványai, No. 1, p. 34 (1941). — Annals of Math. Statistics, **3,** 257 (1932). — Hung. Acta Mathematica **1,** 4 (1949).
7. *Katzin, L. I., Sandholzer, L. A.* and *Strong, M. E.:* J. Bact. **45,** 265 (1943).
8. *Morse, R. E.:* Food Industries **22,** 1679 (1950).
9. *Stumbo, C. R.:* Food Techn. **2,** 228 (1948).
10. *Stumbo, C. R.:* Adv. Food Res. **2,** 47 (1949).
11. *Stumbo, C. R., Murphy, J. R.* and *Cochran, J.:* Food Techn. **4,** 321 (1950).
12. *Vas, K.* and *Proszt, G.:* Élelmezési Ipar **8,** 230 (1954).
13. *Williams, O. B.* and *Campbell, L. K.:* Food Res. **16,** 347 (1951).

ГИБЕЛЬ СПОР БАКТЕРИЙ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ТЕПЛОТЫ В ПРИСУТСТВИИ ХИМИКАТОВ

К. Ваш и *Г. Прост*

Р е з ю м е

Авторы старались посредством различных химикатов и антибиотиков повысить скорость гибели спор бактерий, наступающей под воздействием теплоты. Воздействие на теплостойкость только в том случае считается эффективным, если способно заменить повышение температуры равное 10—20 С°. На основании анализа кривых гибели под воздействием тепла, построенных в результате опытов, проведенных в присутствии бензойной, салициловой, дегидроуксусной и левулиновой кислот, метилового эфира параоксибензойной кислоты, нитрата калия, бромида цетила и пиридина, пенициллина, стрептомицина, хлоромицетина и ауремицина, а также и без применения химикатов [определение времени, необходимого для сокращения числа спор до 0,1 (значение-*D*), коэффициента теплоты или тепловой характеристики (μ)], авторы установили, что в данных случаях значительное понижение времени, необходимого для сокращения числа спор до 0,1 посредством химикатов не оказалось возможным. Воздействие наиболее эффективного химиката не оказалось возможным. Воздействие наиболее эффективного химиката было эквивалентно только 1– 2 градусному повышению температуры. Исследования, проведенные в среде с $p_H = 7$ и повторенные в средах с $p_H = 6$ и $p_H = 4{,}5$, показывают, что химикаты не оказывают значительного влияния на теплостойкость спор. Во всяком случае снижение p_H уже и само собой значительно снижало теплостойкость спор.

На основании вышеуказанного можно установить, что успешные результаты термообработки, комбинированной с применением химикатов, достигаются не под воздействием химикатов на теплостойкость, а являются последствием каких-нибудь других причин, как, например, торможения прорастания спор или оказываемого термообработкой сублетального воздействия.

EXPERIMENTELLE ANGABEN ZUR CHEMOTHERAPEUTIK DER BRUZELLOSE I.*

Von

E. JENEY und T. ZSOLNAI

Mikrobiologisches Institut der Medizinischen Universität, Debrecen

(Eingegangen am 14. Mai 1954)

Zu der chemotherapeutischen Bekämpfung der durch Bruzellen verursachten Infektionen wurden sowohl auf dem Gebiete der Humantherapeutik als auch in der Veterinärmedizin, sowohl auf grundsätzlicher Basis als auch *in vitro* zahlreiche Versuche ausgeführt.

Laut Versuche *in vitro* üben auf *Brucella abortus* Trypaflavin in einer Konzentration von 1 : 1 000 000 [1], Rivanol in einer Konzentration von 1 : 40 000 [2], nach anderen Forschern in einer solchen von 1 : 200 000 [3], Pyozyanin in einer Konzentration von 1 : 1 000 000 [4], Sulfanylamid und p,p'-Dioxy-diphenylsulfid in einer Konzentration von 1 : 1000 [5], Sulfathiazol [6], Sulfapyridin [7] 1 : 800, 2-Methyl 1,4-naphtochinon in einer Konzentration von 1 : 200 000—1 : 800 000 [8], Patulin und sein Thiosemikarbazon in einer Konzentration von 1 : 20 000 [3] und Hydrochinon in einer Konzentration von 1 : 8000 [3] eine bakteriostatische Wirkung aus.

Die experimentelle Bruzellose vom Meerschweinchen konnte dagegen durch Thionin, Collargol, Germanin [9] und Ultraseptyl [10] nicht günstig beeinflusst werden.

Zur Behandlung von humanen Brucella-Infektionen wurden Versuche mit Trypaflavin [11, 12, 13], Thionin [14], Neosalvarsan, Lopion [15, 16, 17], Prontosil [18, 19], Sulfanylamid [20, 21] Sulfapyridin [22] durchgeführt; keines dieser Pharmaka zeigte jedoch eine befriedigende therapeutische Wirkung.

Die Behandlung von natürlichen Brucella-Infektionen bei Tieren wurde mit Akriflavin, Proflavin, Guajacol, Formalin [23], Kreolin [24], Phenol [25, 26, 27], Trypanblau [28, 29], Resorzin, Chinin [30], Mercurochrom [31], Prontosil, Sulfanylamid [7, 32] versucht. Alle diese Experimente erbrachten im allgemeinen ein negatives Ergebnis.

In den letzten Jahren wurde es bekannt, dass einige Antibiotika auf verschiedene Brucella-Stämme sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine stark entwicklungshemmende Wirkung ausüben. Chloromycetin wirkt selbst in einer

* Vortrag gehalten auf der Sitzung vom 26. September 1953. der Ungarischen Mikrobiologischen Gesellschaft in Budapest.

Konzentration von 1 : 500 000 bakteriostatisch auf *Brucella abortus* [33]. Eine gleiche Wirkung konnte auch bei Aureomycin beobachtet werden. Streptomycin vermag in einer Konzentration von 1 : 75 000, Aerosporin in einer solchen von 1 : 750 000 [34], Polymixin in einer Konzentration von 1 : 75 000—1 : 2 000 000 [35] die Entwicklung der Brucella-Stämme zu hemmen. Diese Antibiotika erwiesen sich auch zur Heilung *menschlicher* Brucella-Infektionen als hervorragend geeignet. Wegen ihres hohen Preises und der Grösse der notwendigen Dosen konnten sie dagegen in der Veterinärmedizin keine ausgedehnte Verbreitung finden, so dass die Entdeckung von verhältnismässig billigen, synthetisch herstellbaren chemischen Verbindungen, die eine therapeutische Wirkung gegenüber den tierischen Brucella-Infektionen aufweisen, als eine von Tag vordringlichere Aufgabe erscheint. Das Auffinden solcher Verbindungen ist nicht nur deswegen notwendig und dringend, weil die Quelle der menschlichen Brucella-Infektionen fast immer das Tier ist und mit der erfolgreichen Bekämpfung oder Einschränkung der Bruzellose bei Tieren auch die humanen Brucella-Infektionen seltener würden, sondern auch deswegen, weil die Bruzellose gegenwärtig eine der am weitesten verbreiteten Tierinfektionen ist und das durch sie hervorgerufene Verkalben eine der den grössten wirtschaftlichen Schaden verursachenden Tierkrankheiten darstellt.

Aus diesem Grunde wurden systematische chemotherapeutische Untersuchungen vorgenommen, über deren bisherigen Ergebnisse im nachstehenden berichtet werden soll.

Methodik

Die untersuchten Verbindungen wurden zum grössten Teil von uns selbst auf Grund der in der chemischen Fachliteratur angegebenen Methoden hergestellt (einige wurden erstmals von uns synthetisiert), der Rest stand in Form von Handelsprodukten in der Reinheit *pro analysi* zur Verfügung.

Die Untersuchung der bakteriostatischen Wirkung erfolgte in einer 2% Dextrose enthaltenden Normalbouillon gegenüber dem international verwendeten Stamm «B_{99}» von *Brucella abortus* bei Anwendung von Verdünnungsreihen der betreffenden Verbindung.

Die Verdünnungsreihen wurden derart hergestellt, dass aus einer 2%igen alkoholischen (oder wässrigen) sterilen Lösung der einzelnen Verbindungen 0,1 ml (oder 0,05 ml) zu 5 ml sterilem Nährboden hinzugefügt und aus den so gewonnenen, eine Konzentration von 1 : 2500 oder 1 : 5000) aufweisenden Lösungen 0,5, 0,25, 0,1 und 0,05 ml in 5 ml sterilen Nährboden enthaltende Reagenzgläser bei Einhaltung der Sterilitätsvorschriften eingemessen wurden. Auf diese Weise erhielt man in den einzelnen Reagenzgläsern Verdünnungen von 1 : 25 000, 1 : 50 000, 1 : 125 000 1 : 250 000 (bzw. 1 : 500 000) der zu untersuchenden Verbindung.

Danach wurde der Inhalt der Reagensgläser mit je einem Tropfen einer viertägigen, in einer dextrosehaltigen Bouillon gezüchteten Kultur des *Brucella abortus* «B_{99}»-Stammes mit Hilfe einer Pasteurschen Kapillare beimpft und die Gläser im Thermostaten bei 37° C inkubiert. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte nach 4 Tagen mit dem blossen Auge, auf Grund eines Vergleiches der Turbidität mit den Kontrollen. Als bakteriostatisch wurde jene Konzentration der untersuchten Verbindungen angesehen, bei der sich nach Ablauf der Inkubationszeit — bei der angewandten Versuchsmethode — kein Wachstum der Bakterien mehr zeigte.

Mit jeder Konzentration jeder Verbindung wurden innerhalb einer Versuchsreihe stets drei Parallelversuche angesetzt, wobei jede Versuchsreihe 3- bis 5mal wiederholt wurde. Jede hier mitgeteilte Angabe beruht also auf dem Ergebnis von 9 bis 15 Beobachtungen. Die Zahlenwerte der bei der Ablesung der Ergebnisse erhaltenen bakteriostatischen Grenzverdünnungen

(sowie auch die der innerhalb einer Versuchsreihe ausgeführten Paralleversuche), die beim wiederholten Ansetzen der einzelnen Versuchsreihen gewonnen wurden, stimmten abgesehen von einer minimalen Schwankung stets miteinander überein.

Der zur Lösung der Verdünnungen benutzte Alkohol übte — wie die nur mit Alkohol ausgeführten Kontrollversuche bewiesen — in den bei diesen Versuchen angewandten Konzentrationen auf den *Brucella abortus*-Stamm «B_{99}» überhaupt keine bakteriostatische Wirkung aus, er beeinflusste demnach auch nicht die Ergebnisse.

Ergebnisse

Die untersuchten Verbindungen werden — in entsprechende Gruppen zusammengefasst — in den nachstehenden Tabellen vorgeführt, wobei auch stets ihre für den *Brucella abortus* «B_{99}»-Stamm bakteriostatische Grenzverdünnung angegeben wird.

Lfd. Nr.	Verbindung	Bakteriostatische Grenzverdünnung
	I. Phenolderivate	
6.	2,4-Dibrom-6-methyl-phenol	1 : 250 000
7.	2,6-Dibrom-4-methyl-phenol	1 : 250 000
8.	2,4,6-Tribrom-phenol	1 : 250 000
11.	4-Hexyl-resorcin	1 : 250 000
12.	Tetrabrom-pyrokatechin	1 : 250 000
15.	4-4'-Dioxy-1,1'-dinaphthyl	1 : 50 000
16.	2,2'-Dioxy-1,1'-dinaphthyl	1 : 50 000
17.	2,2'-Dioxy-1,1'-dinaphthyl-methan	1 : 250 000
19.	1-Diäthylamino-methyl-2-naphthol	1 : 250 000
21.	8-Oxy-chinolin (= Oxin)	1 : 125 000
22.	5-Chlor-7-jod-8-oxy-chinolin (= Vioform)	1 : 500 000
24.	4-Phenylazo-phenol	1 : 125 000
	II. Nitrophenole	
34.	2,4-Dinitro-6-methylphenol	1 : 50 000
41.	2,4-Dinitro-1-naphthol	1 : 50 000
	III. Nitrosoverbindungen	
44.	2,6-Dinitroso-4-hexyl-resorcin	1 : 50 000
45.	1-Nitroso-2-naphthol	1 : 125 000
46.	4-Nitroso-dimethyl-anilin	1 : 125 000
47.	4-Nitroso-diäthyl-anilin	1 : 50 000
49.	N-Nitroso-diphenylamin	1 : 50 000
	IV. Chinone	
51.	1,4-Naphthochinon	1 : 50 000
52.	2-Methyl-1,4-naphthochinon	1 : 125 000
53.	Vitaplex K «Chinoin»	1 : 50 000
56.	2,3-Dichlor-1,4-naphthochinon	1 : 50 000
	V. Ungesättigte Ketone	
58.	Benzalacetophenon	1 : 50 000
59.	Furfuralacetophenon	1 : 50 000

Lfd. Nr.	Verbindung	Bakteriostatische Grenzverdünnung
	VI. Hydroxylaminderivate	
71.	Phenylhydrazin	1 : 125 000
72.	p-Nitrophenylhydrazin	1 : 125 000
85.	Furfurol-phenylhydrazon	1 : 50 000
86.	5-Nitrofurfurol-phenylhydrazon	1 : 50 000
88.	2-Oxy-5-methyl-benzaldehyd-phenylhydrazon	1 : 50 000
94.	5-Nitrofurfurol-p-nitrophenylhydrazon	1 : 50 000
99.	d-Xylosazon	1 : 50 000
100.	1-Rhamnosazon	1 : 50 000
	VII. Basische Verbindungen	
115.	4,4'-Diphenyl-N,N^1-bis-diguanidin-chlorhydrat	1 : 50 000
119.	Bis-(β-benzoyl-äthyl)-methylamin-chlorhydrat	1 : 50 000
120.	Tri-(β-benzoyl-äthyl)-amin-chlorhydrat	1 : 50 000
122.	1-Methyl-3-benzoyl-4-hydroxy-4-phenyl-piperidin	1 : 50 000
123.	1-Methyl-1-äthyl-3-benzoyl-4-hydroxy-4-phenyl-piperidinium-äthyl-sulfat	1 : 125 000
138.	3,6-Diamino-10-methyl-akridinium-chlorid (=Trypaflavin)	1 : 1 000 000
139.	3,6-Di-thiokarbamido-10-methyl-akridinium-rhodanid	1 : 250 000
140.	3,6-Di-(N^1-diguanidino)-10-methyl-akridinium-chlorid	1 : 125 000
141.	3,4-5,6-Di-(6'-methyl-pyridino-2'3',)-10-methyl-akridinium-chlorid	1 : 50 000
142.	2-Äthoxy-6,9-diamino-akridinlaktat (= Rivanol)	1 : 125 000
	VIII. Farbstoffe	
145.	Gentianviolett	1 : 500 000
146.	Kristallviolett	1 : 500 000
147.	Viktoriablau	1 : 125 000
148.	Malachitgrün	1 : 1 000 000
149.	Brillantgrün	1 : 500 000
150.	Safranin	1 : 50 000
151.	Nilblau	1 : 50 000
152.	Methylenblau	1 : 50 000
153.	Toluidinblau	1 : 250 000
154.	Thionin	1 : 50 000
	IX. Andere Verbindungen	
174.	1-Nitroso-2-naphtol-Kupfer	1 : 125 000
175.	Kalium-methyldithiocarbamat	1 : 500 000
176.	Zink-methyldithiocarbamat	1 : 500 000
177.	Kupfer-methyldithiocarbamat	1 : 250 000
178.	Kobalt-methyldithiocarbamat	1 : 50 000
179.	Kalium-diäthyldithiocarbamat	1 : 50 000
180.	Zink-diäthyldithiocarbamat	1 : 250 000
182.	Zink-äthylxanthogenat	1 : 250 000
183.	Kupfer-äthylxanthogenat	1 : 125 000

Folgende Verbindungen erwiesen sich selbst in einer Verdünnung von 1 : 50 000 nicht als bakteriostatisch:

Phenolderivate; Hydrochinon, 4-Methylamino-phenol, 4-Chlorphenol, 4-Brom-phenol, 2,4-Dichlor-phenol, 2-Iso-propyl-5-methyl-phenol (= Thymol), 4-Oxy-3-methoxy-benzaldehyd (= Vanillin), 1-Naphtol, 2-Naphtol, 2-Oxy-1-

naphtaldehyd, 9-Anthron, 2,2'-Dioxy-1,1'-diphenyl-disulfid, 5-Phenylazo-2-oxy-benzoesäure, 4-Phenylazo-resorcin, 2-Phenylazo-4-methyl-phenol, 2-phenylazo-4-methyl-phenol-4'-Sulfonsäure, 4,4'-Tetrazo-diphenyl-bis-(2-oxy-benzoesäure-5) (= Chrisamin), 1-Phenylazo-2-naphtol, 4-Phenylazo-1-naphtol.

Nitrophenole : 4-Nitrophenol, 2,4-Dinitrophenol, 2,6-Dinitro-4-methyl-phenol, 2, 4, 6-Trinitro-phenol (= Pikrinsäure), 2,4-Dinitro-6-chlor-phenol, 2,6-Dinitro-4-chlor-phenol, 2,4-Dinitro-resorcin, 3,5-Dinitro-2-oxy-benzoesäure.

Nitrosoverbindungen : 4-Nitroso-phenol, 2,4-Dinitroso-resorcin, 3-Nitroso-4-dimethylamino-benzaldehyd.

Chinone : 1,4-Benzochinon, Tetrachlor-1,4-benzochinon, Trichlor-toluchinon, 2,5-Di-(2'-pyridil-)-3,6-dichlor-1,4-benzochinon.

Ungesättigte Ketone : Dibenzalaceton, Di-(4-dimethylaminobenzal)-aceton, Dibenzalcyclohexanon, Difurfuralaceton, Santonin, Benzalacetophenon-dibromid, Dibenzalaceton-tetrabromid.

Hydroxylaminderivate : Hydroxylamin-chlorhydrat, Furfuroloxim, 5-Nitrofurfurol-oxim.

Hydrazinderivate : Hydrazin, Furan-α-karbonsäure-hydrazid, Isonikotinsäure-hydrazid, 2-Phenyl-chinolin-4-karbonsäure-hydrazid, 2-Phenyl-chinolin-4-karbonsäure-phenylhydrazid, Phthalsäure-hydrazid, Maleinsäure-phenylhydrazid, N,N'-Diphenyl-N''-amino-guanidin, N^1-Phenylamino-diguanidin-chlorhydrat, 4-Phenyl-thiosemikarbazid, 4-Acetylamino-benzaldehydthiosemikarbazon (= Thiomicid), Benzaldehyd-phenylhydrazon, 4-Dimethylamino-benzaldehyd-phenylhydrazon, 4-Acetylamino-acetophenon-phenylhydrazon, 2-Oxy-1-naphtaldehyd-phenylhydrazon, Acetessigester-phenylhydrazon, Benzaldehyd-p-nitro-phenylhydrazon, 4-Dimethylamino-benzaldehyd-p-nitrophenyl-hydrazon, Furfurol-p-nitrophenylhydrazon, Furoin-p-nitro-phenylhydrazon, Furyl-p-nitrophenylhydrazon, d-Glukosazon, d-Galaktosazon, Benzaldazin, 4,4'-Bis-dimethylamino-benzaldazin, Acetophenon-azin, 4-Acetylamino-acetophenon-azin, Furfuraldazin, 5,5'-Dinitro-furfuraldazin, Furoin-azin, 2,2'-Dioxy-5,5'-dimethyl-benzaldazin, 2,2'-dioxy-1,1'-naphtaldazin.

Basische Verbindungen : 4-Amino-azobenzol-chlorhydrat, N,N'-Diphenyl-guanidin, N,N'-Di-(4-diäthylamino-phenyl-)thiokarbamid, N^1-Phenyl-diguanidin-chlorhydrat, p-Phenylen-N^1,N^1-bis-diguanidin-chlorhydrat, 4-Aminobenzoesäure-β-diäthylamino-äthylester-chlorhydrat (= Novocain), 4-Butylaminobenzoesäure-β-dimethylamino-äthylester-chlorhydrat (= Pantocain), β-Diäthylamino-propiophenon, 2,6-Bis-(diäthylamino-methyl)-cyclohexanon-(*1*), 1-Phenyl-2,5-dimethyl-1,4-dihydro-pyrazin, 1-Furfuryl-2-α-furyl-benzimidazol, 11-(5'-Nitrofurfuryl)--2-(5'-nitro(-α-furyl)-benzimidazol, 1-Benzyl-2-phenyl-benzimidazol, 2-Methyl-benzimidazol, 2-n-Amyl-benzimidazol, 1,5-Diphenyl-3-styryl-pyrazolin-(4,5), 5-Phenyl-3,4-(3'-benzal-hexahydro-benzo-1',2'(-pyrazolin(4,5), 1,5-Diphenyl-3,4-(3'-benzal-hexahydro-benzo-1'2')-pyrazolin-(4,5), 2,2'-Dipyridil, 2-Methyl-6-amino-chinolin, Chinin-chlorhydrat, Optochin-chlor-hydrat, Triphenyl-

tetrazolium-chlorid, 2-Methoxy-6-chlor-9-(α-diäthylamino-γ-pentylamino)-akridin-dichlorhydrat (= Atebrin).

Farbstoffe: Fuchsin, Pyronin, Methylgrün, Trypanblau, Neutralrot.

Andere Verbindungen: Furan-α-karbonsäure, Furfuryl-alkohol, Furfurol, Benzaldehyd, Furoin, 2,4,6-Tribrom-anilin, 2,6-Dibrom-4-nitro-anilin, 3,5-Dibrom-nitrobenzol, N-Phenyl-maleinimid, N-Phenyl-phthalimid, Isatin, 1,3-Diketohydrinden, Di-(4-oxycumarinyl)essigsäure-äthylester (= Pelentan), 2-Merkapto-4-phenyl-thiadiazolin-(4,5)-kalium, Kalium-äthylxanthogenat.

Diskussion

Im Laufe der durchgeführten Untersuchungen erwiesen sich Trypaflavin und Malachitgrün als die am stärksten (1 : 1 000 000) bakteriostatisch wirksamen Mittel gegenüber dem *Br. abortus*-Stamm «B_{99}». Allerdings übt Trypaflavin nach ausländischen Verfassern [11, 12, 13, 23] trotz seiner grossen bakteriostatischen Wirkung *in vitro* weder auf die menschliche noch auf die tierische Bruzellose eine therapeutische Wirkung aus. Da das Malachitgrün viel toxischer als das Trypaflavin ist, dürfte es nicht wahrscheinlich sein, dass es bei Brucella-Infektionen eine therapeutische Wirkung aufweist. Dasselbe gilt auch für die übrigen, als stark wirksam gefundenen organischen Farbstoffe, wie Gentianviolett, Kristallviolett, Brillantgrün und Toluidinblau.

Verschiedene Halogenphenole erwiesen sich *in vitro* noch in einer Verdünnung von 1 : 250 000 als bakteriostatisch, doch ist von den Phenolderivaten bekannt, dass sie sich *in vivo* rasch inaktivieren — teils infolge ihrer Bindung an die Plasmaeiweisse und teils infolge ihrer Verknüpfung mit Glukuronsäure oder Schwefelsäure und ihrer nachfolgenden schnellen Ausscheidung aus dem Organismus. Therapeutische Erfolge darf man also von ihnen nicht erwarten.

Die Dithiokarbamate und die Xanthogenate, sowie einige ihrer Schwermetallsalze zeigten unter den angewandten Versuchsverhältnissen dem *Br. abortus*-Stamm «B_{99}» gegenüber *in vitro* bei einer Verdünnung von 1 : 250 000—1 : 500 000 eine bakteriostatische Wirkung. Im Laufe vorhergehender Toxizitätsversuche hatte sich ihre Toxizität an verschiedenen Laboratoriumstieren (Ratten, Mäusen, Meerschweinchen) und Haustieren (Huhn, Schwein, Rind, Schaf) als verhältnismässig niedrig erwiesen; ihre bakteriostatische Wirkung wird von Blutserum oder Formelementen nicht verringert. Aus diesem Grunde wurde nun die Untersuchung ihrer Wirkung auf die experimentelle Bruzellose bei verschiedenen Laboratoriumstieren beschlossen und in Angriff genommen.

Zusammenfassung

1. Es wurde die bakteriostatische Wirkung von 183 Verbindungen auf den international benutzten *Brucella-abortus*-Stamm «B_{99}» *in vitro* in einer 2%

Dextrose enthaltenden Normalbouillon bei Anwendung von Verdünnungsreihen untersucht (Konzentrationen von 1 : 25 000—1 : 500 000 bzw. 1 : 1 000 000).

2. Für therapeutische Versuche scheinen sich von den untersuchten Verbindungen am besten die Dithiokarbamate und die Xanthogenate sowie deren Schwermetallsalze zu eignen : sie sind noch in einer Konzentration von 1 : 250 000—1 : 500 000 bakteriostatisch, ihre Wirkung wird weder vom Blutserum noch von Formelementen verringert und ihre Toxizität ist niedrig.

LITERATUR

1. *Hassko, A.:* Berl. tierärztl. Wschr. 619 (1931).
2. *Wicht, E.:* Zbl. Bakt. I. Orig. **131,** 54 (1934).
3. *Lembke, A., Körnlein, M., Frahm, H.:* Zbl. Bakt. Orig. **155,** 16 (1950).
4. *Гаузе, Г. Ф.:* Лекции по антибиотикам, Москва 1949, стр 164.
5. *Menefee, Poston:* J. Bakter. **37,** 269 (1939).
6. *Northey, E. H.:* The Sulfonamides and Allied Compounds. New York (1948) S. 600.
7. *Hamann, Huddleson, J. F.:* J. Am. Vet. Med. Assoc. **94,** 35 (1939).
8. *Nascimbene, A.:* Il Farmaco **3,** 622 (1948).
9. *Miessner, Köser:* Dtsch. tierärztl. Wschr. 593 (1934).
10. *Morales-Otero, Pomales Lebron:* Proc. Soc. exp. Biol. Méd. **45,** 512 (1948).
11. *Lemierre, Mahondeau-Compayer:* Presse med. 339 (1932).
12. *Jones, O.:* Brit. med. J. 645 (1935).
13. *Малтовская, О.:* Врачебн. газ. 13—14 (1930).
14. *Lesvell, Amoss:* Amer. J. med. Sci. **181,** 96 (1931).
15. *Onetto, E.:* Immunitätsforsch. **69,** 430 (1931).
16. *Fischer, Rolf, Schenk:* Münch. med. Wschr. 263 (1936).
17. *Steyrer, A.:* Münch. med. Wschr. 277 (1934).
18. *Ahringsmann, H.:* Münch. med. Wschr. 1778 (1937).
19. *Francis, E.:* Lancet I. 495 (1938).
20. *Blumgart, H.:* J. A. M. A. III. 521 (1938).
21. *Stern, Blake:* J. A. M. A. **110,** 1550 (1938).
22. *Bonnano, A.:* Boll. Soc. int. Micr. Sez. Ital. **12,** 191 (1948).
23. *Kitselman, Ch.:* J. Am. vet. med. Assoc. **84,** 603 (1934).
24. *Linke, O.:* Vet. med. Diss., Berlin (1936).
25. *Ott, H.:* Schweiz. Arch. Tierhk. **80,** 445 (1938).
26. *Wyssmann, E.:* Schweiz. Arch. Tierhk. **80,** 229 (1938).
27. *Wyssmann, E.:* Schweiz. Arch. Tierhk. **80,** 448 (1938).
28. *Rudolf, J.:* Arch. Tierhk. **63,** 147 (1931).
29. *Hulten, O.:* Wien. tierärztl. Wschr. **20,** 209 (1933).
30. *Manninger, R.:* Dtsch. tierärztl. Wschr. 799 (1936).
31. *Moussu, Courtehoux:* Rec. Med. vet. **106,** 185 (1930).
32. *Müler, Mingle, Murdock, Heishman:* J. Am. vet. med. Assoc. **94,** 161 (1939).
33. *Ehrlich J.* u. *Mitarbeiter:* Science, **106,** 417 (1947).
34. *Brownlee, G., Bushby, S.:* Lancet **254,** 127 (1948).
35. *Stanshby, P. G., Shepherd, R. G., White, H. J.:* Bull. Johns Hopkins Hosp. **81,** 43 (1947).

ОПЫТНЫЕ ДАННЫЕ ПО ХЕМОТЕРАПИИ БРУЦЕЛЛЕЗА I.

Э. Енеи и *Т. Жольнаи*

Резюме

1. Авторы исследовали **in vitro** бактериостатическое действие 183 химических соединений, относящихся к 10 группам соединений, на применяемый международно штамм **Br. abortus** »B_{99}«. Исследование производилось в нормальном бульоне, содержащем 2% декстрозы, с помощью метода серийных разведений. (Концентрации : 1 : 25 000—1 : 500 000 или 1 : 1 000 000.)

2. Для терапевтических экспериментов из исследованных соединений наиболее хорошие результаты обещают дитиокарбаматы, ксантогенаты, а также их тяжелые соли ; в концентрации 1 : 250 000 – 1 : 500 000 оказывают бактериостатическое действие ; сыворотки и форменные элементы не ослабляют этого действия. Токсичность их является низкой.

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE WECHSELWIRKUNG NICHTANTIBIOTISCHER PILZE UND BAKTERIEN

Von

J. SINKOVICS

Staatliches Institut für Volksgesundheitswesen, Budapest

(Eingegangen am 19. Juni 1954.)

Die Untersuchung über die Wechselwirkung von Pilzen niedriger Ordnung und Bakterien gewährt uns einen Einblick in den Kampf, der seit Jahrmillionen in der Natur vor sich geht und dessen Ausgang in zahllosen Variationen vor uns erscheint. Diesbezügliche Forschungen hängen eng mit der Frage der Herkunft antibiotischer Stoffe zusammen. *Imschenezki* [4] stellte im Jahre 1947 fest, dass jene theoretischen Arbeiten, die sich mit der Herkunft der Antibiotika befassen, in der Literatur sozusagen vollkommen fehlen: es wurde nicht entschieden, ob diese Stoffe *Stoffwechselprodukte* von Bakterien und Pilzen sind, oder *Mittel im Kampfe ums Dasein*, die sich im Laufe der Evolution ausbildeten bzw. ausbilden. Nach *Waksman* [20] z. B. ist das Penicillin unter natürlichen Verhältnissen dem Pilz im Kampfe ums Dasein schwerlich von Nutzen. Demgegenüber nahmen *Tokin* [17] bzw. *Gause* [2] schon frühzeitig den Standpunkt ein, dass die Antibiotika im Daseinskampf erworbene Stoffe sind. Zweifellos ist, dass dieser Auffassung bisher nur sehr wenig Versuchsangaben zugrunde liegen. In den letzten Jahren jedoch erreichten *Streschinski* [16] bzw. *Wasilenko* [19], dass in der Mischkultur von B. subtilis und Penicillium notatum der erstere Mikroorganismus einen bis dahin unbekannten Stoff zu erzeugen begann, der das Wachstum der Pilzfäden hemmte, bzw. dass aerobe Sporenbildende Bazillen, mit Typhus- und Colibakterien zusammen gezüchtet, durch Ausscheidung eines neuen antibiotischen Stoffes plötzlich das Wachstum der letzteren zu hindern anfingen.

Die eigenen Untersuchungen gingen davon aus, dass es gelingen wird, ursprünglich nichtantibiotische Pilze durch serienweise Zusammenzüchtung mit Bakterien zu antibiotikumerzeugenden umzugestalten.

Versuchsmaterial und Methoden

Nichtantibiotische Pilz- und Bakterienstämme. — Die Untersuchungen wurden mit folgenden Mikroorganismen durchgeführt: näher nicht bestimmte Actinomyces (Corynebacterium), Herkunft: menschliche Haut; näher nicht bestimmte mauspathogene Nocardia, Herkunft: Mäuselunge; näher nicht bestimmter Streptomyces, Herkunft: Gartenerde. Die approximative

Bestimmung dieser Mikroorganismen erfolgte nach dem Manual of Determinative Bacteriology [12]. Aspergillus niger, Mucor mucedo, näher nicht bestimmtes Penicillium, Herkunft: menschlicher Speichel bzw. verunreinigten Nährböden. Botrytis cinerea, Epidermophyton inguinale Sabouraud, näher nicht bestimmtes Sporotrichon, Trichophyton gypseum und Trichothecium roseum, Herkunft: menschliche Haut. Diese Pilze wurden von *Dr. P. Polgár* bestimmt, vor allem auf Grund ihrer Eigenarten, die sie bei Züchtung im hängenden Tropfen aufwiesen. E. coli, Herkunft: menschliche Cysto-Pyelitis; Staphylococcus aureus, Herkunft: menschliche Furunkulose.

Antibiotikumbestimmungen. — Bei den Versuchen befassten wir uns lediglich mit Mikroorganismen, die sich nicht als antibiotikumerzeugende erwiesen. Die Nährflüssigkeit von 1, 2 und 5 Wochen alten Pilzkulturen und die Extrakte in physiologischer Kochsalzlösung derselben verriebenen Kulturen wurden E. coli und Staph. aureus gegenübergestellt, auf Agarplatte mit Zylindermethode, ferner in Bouillon mit Seriendilutionsmethode untersucht. Die Züchtung der Pilze und Aktinomyzeten erfolgte in 4% Dextrose enthaltender Bouillon; Inkubation auf Zimmertemperatur.

Versuchsergebnisse

In *junge* (7—10tägige) Kulturen von Fadenpilzen, ferner von Actinomyces- (Corynebacterium-), Streptomyces- und Nocardiastämmen wurden 0,05 ml der 24stündigen Bouillonkultur von E. coli bzw. Staph. aureus geimpft. Binnen 24—48 Stunden kam in sämtlichen Kulturen diffuses Bakterienwachstum zustande. Im Laufe der weiteren Inkubation jedoch stellte sich heraus, dass das Wachstum der Actinomyces- (Corynebacterium-), Nocardia-, Streptomyces- und Epidermophyton inguinale-Kulturen stehen geblieben ist, ja, dass diese Mikroorganismen selbst ihre Überimpfbarkeit verloren haben. Unser Botrytis cinerea-Stamm der bereits bei seiner Züchtung Staphylococcus mit sich trug, erwies sich als mit E. coli zusammen züchtbar. Unser Mucor-Stamm verhielt sich gegen die zwei Bakterien ähnlich. In der Kultur des Trichothecium roseum wuchs der Staphylococcus besonders gut; als die Nährflüssigkeit des Pilzes mit Zylindermethode untersucht wurde, stellte sich heraus, dass sie irgendeinen Anregungsstoff enthielt, da der Wuchs der Bakterien um den Zylinder in Form eines Diffusionsringes viel stärker war, als auf entfernteren Punkten des Nährbodens. Derselbe Pilz vertrug auch E. coli in seiner Kultur. Demgegenüber befreiten sich unsere Aspergillus-, Penicillium-, Sporotrichon- und Trichophyton-Stämme in kurzer Zeit von den in ihre Kulturen geimpften Bakterien, trotzdem sie am Anfang des Versuches, ebenso wie die anderen untersuchten Mikroorganismen, keinerlei antibiotische Eigenschaften aufwiesen. Mit diesen letzteren Pilzen befassten wir uns eingehender.

Den Gegenstand der Untersuchung bildete vor allem der Antibiotikumgehalt der Nährflüssigkeit der letzteren Gruppe in verschiedenen Zeitpunkten der Zusammenzüchtung mit den Bakterien. Es gelang jedoch weder in den Nährflüssigkeiten noch in den Extrakten der verriebenen Pilzkulturen antibiotische Stoffe zu finden. Nachdem wurden die Nährflüssigkeiten darauf untersucht, ob sich kein bisher latenter (symbiotischer) Bakteriophag in der Mischkultur aktiviert hätte. Aktiver Bakteriophag konnte in keinem einzigen

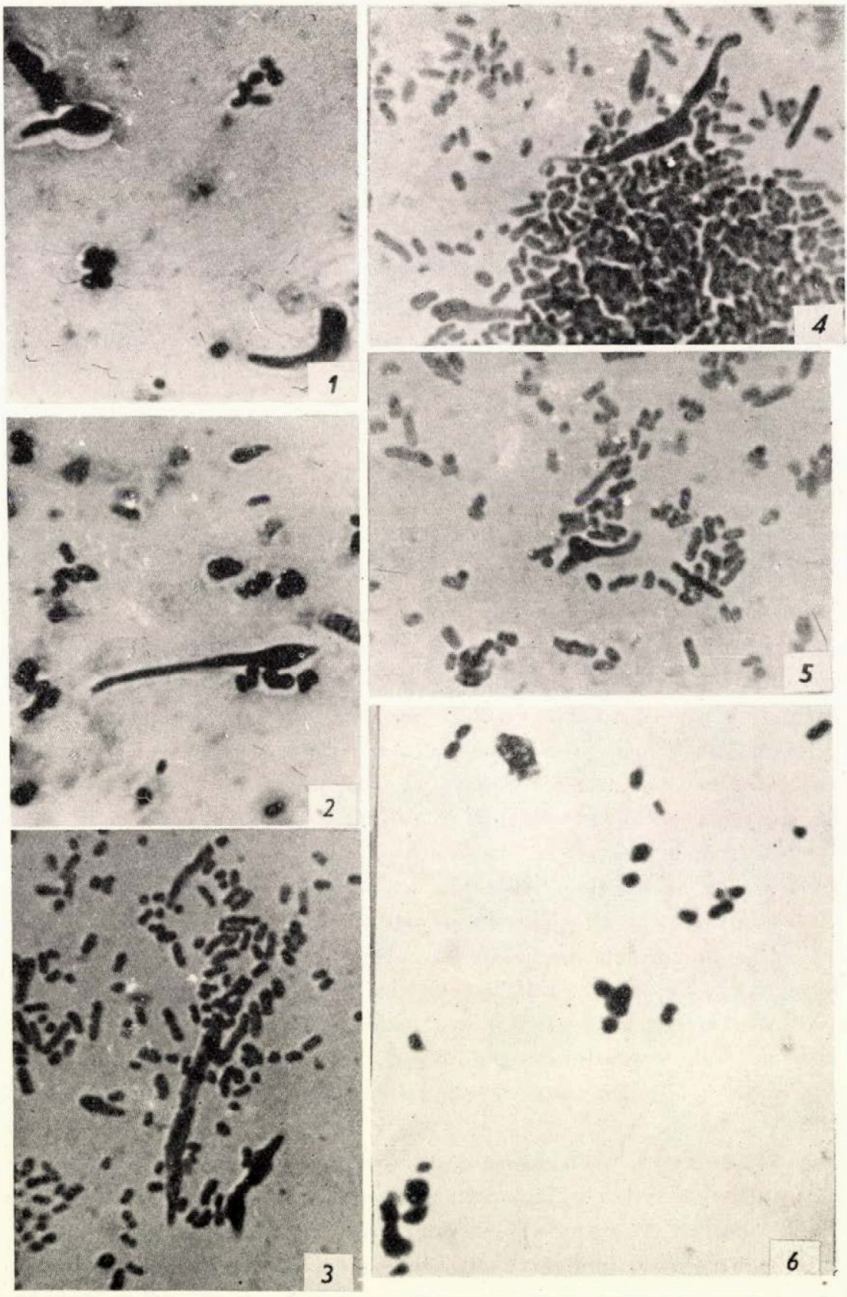


Abb. 1—6. Spindelförmige und gigantische Zellen von *E. coli* im Sediment einer jungen Kultur des *Sporotrichon*-Pilzes. 1600 : 1. Dubosq-Brasil-Bouin-Fixierung, Giemsa-Färbung.

Fall in der Nährflüssigkeit unserer, während der Zusammenzüchtung bakterienfrei gewordenen Pilzstämme nachgewiesen werden. Schliesslich wurden die Nährflüssigkeiten so untersucht, dass wir sie nach Herausnahme der oberflächlichen Pilzkultur und Abzentrifugieren des Sediments bzw. nach Filtrieren, mit den entsprechenden Bakterien impften. In diesen pilzfreien Nährflüssigkeiten begann ein störungsloses Bakterienwachstum. — Die Dynamik der antibakteriellen Wirkung der nichtantibiotischen Pilze gestaltete sich im Laufe der Zusammenzüchtung wie folgt. Die jungen Pilzkulturen wuchsen in Form von oberflächlichem Belag. Wurden unter die Kultur Bakterien geimpft, so vermehrten sich diese schnell und trübten den ganzen Nährboden. In einigen Tagen wurde aber der Nährboden unter der Pilzkultur in einem schmalen Streifen klar. Dieser Streifen wurde sodann von Tag zu Tag breiter, zugleich wiesen die pilzfreien Bakterienkulturen noch diffuses Wachstum auf. Schliesslich wurde die Bakterienkultur in Form von scheibenartigem Sediment auf den Boden der Röhre zurückgedrängt und die Nährflüssigkeit wurde wieder vollkommen klar ; weder aus der verriebenen Pilzkultur noch aus der klar gewordenen Nährflüssigkeit gelang es, Bakterienkulturen zu gewinnen. — Im Falle von E. coli wiesen die ins Sediment gelangten Bakterienzellen besondere morphologische Veränderungen auf : neben spindelförmigen, gigantischen Zellen und solchen von körniger Struktur sind sich lösende und in kleine Körner zerfallende Bakterien ersichtlich (Abb. 1—10). Die Seitz EK-Filtrate des mit Pipette herausgenommenen Bakteriensediments ergaben Kulturen die mit 5—10 Tage Verzögerung zu wachsen beginnen, in einer sehr geringen Anzahl der mit einem Filtrat beimpften flüssigen Nährböden auch dann, wenn das Filtrieren mit einem niedrigeren Vakuum als 30—40 Hgmm ausgeführt und nur das in den ersten 5 Minuten gewonnene Filtrat aufgefangen wurde. In den vom Sediment solcher Kulturen hergestellten Ausstrichen sind Körner und Kokkobazillen verschiedener Grösse zu sehen (Abb. 11—12). Bei weiterer Inkubation gestalteten sich diese Kulturen in typische Reinkulturen von E. coli um. — Während derselben Zeit bestanden die pilzfreien Colikulturen bereits aus vollkommen regelmässigen Individuen ; Filtrierversuche wurden an den Kulturen nicht durchgeführt. Wurden hingegen flüssige Nährböden mit 3—4 vegetative Keime enthaltenden hohen Verdünnungen dieser Kulturen geimpft, so erhielten wir *binnen 48 Stunden* aus regelmässigen Individuen bestehende dicke Reinkulturen.

Die Frage muss noch beantwortet werden, ob die nichtantibiotischen Pilze ihre antibakteriellen Fähigkeiten im Laufe der Zusammenzüchtung erworben haben. Unsere Erfahrung war, dass sich *in jungen Pilzkulturen* die Bakterien fast immer vermehrten und mit dem Altern der Kulturen langsam ausstarben. *In ältere Pilzkulturen* geimpfte Bakterien hingegen wiesen selbst eine anfängliche Vermehrung nicht auf. In solchen Fällen kam es vor, dass, wenn man von als bakterienfrei erscheinender Nährflüssigkeit in pilzfreien Nährboden

überimpfte, Bakterienwachstum begann. Wenn man jedoch von der Mischkultur die Pilze überimpfte, kamen im neuen Nährboden folgende Verhältnisse zustande: die Nährflüssigkeit des Sporotrichon-Pilzes erwies sich bezüglich bei der Bakterien als steril; aus der Nährflüssigkeit des Trichophyton-Pilzes konnte Staphylococcus nie, E. coli von Fall zu Fall gezüchtet werden, sobald aber die Pilzkultur älter wurde, wurde die Nährflüssigkeit colifrei; ähnlich verhielten sich unsere Penicillium- und Aspergillus-Stämme. Die Pilzkulturen wiederum überimpfend, erwiesen sich die Sporotrichon- und Trichophyton-

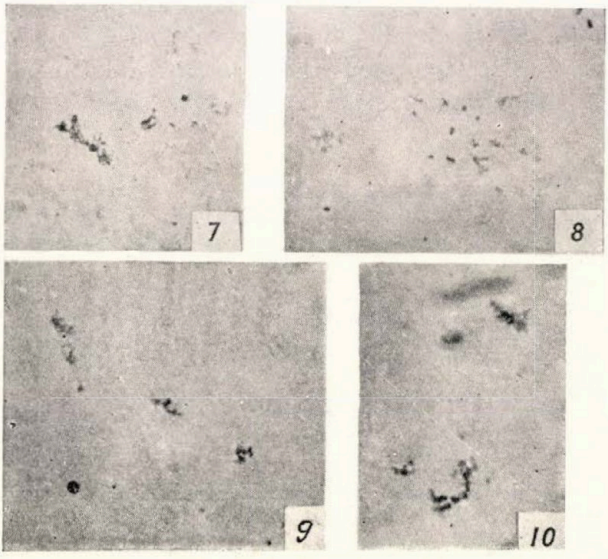


Abb. 7—10. Kleinkörniger Zerfall und Lösung der Zellen von *E. coli* im Sediment einer jungen Kultur des *Sporotrichon*-Pilzes. 1200: 1. Dubosq-Brasil-Bouin-Fixierung, Giemsa-Färbung

kulturen als vollkommen bakterienfrei, die Aspergillus- und Penicilliumkulturen aber nur vom Gesichtspunkt des Staphylococcus als steril; es gelang jedoch — obwohl die Flüssigkeit der Pilzkulturen bakterienfrei schien —, E. coli von diesen zu züchten. Die abgesonderte Nährflüssigkeit der bakterienfreien Pilze enthielt auch diesmal keinen nachweisbaren antibiotischen Stoff.

Besprechung der Ergebnisse

Bei Pilzen die nachweisbar keinen antibiotischen Stoff erzeugen, wurde ausgesprochene antibakterielle Wirkung wahrgenommen. Die Ursache dieser Wirkung konnte weder in der Erschöpfung der gemeinsamen Nährflüssigkeit noch im Aktivwerden eines symbiotischen Phags gefunden werden. So lässt sich die antibakterielle Wirkung lediglich durch einen an die Anwesenheit des aktiv wachsenden Pilzes gebundenen, von ihm kontinuierlich erzeugten, schnell

zersetzenden antibakteriellen Stoff erklären. Auf diese Möglichkeit weist vor allem die Dynamik der antibakteriellen Wirkung hin. Von diesem Gesichtspunkt aus können auch die pathologischen Veränderungen bewertet werden, welche bei E. coli in den Pilzkulturen, im Vergleich zu den im pilzfreien Nährboden gezüchteten Bakterien zu sehen sind. Solche Veränderungen auf Wirkung *bekannter* Antibiotika beobachteten vor allem *Dienes* und *Weinberger* [1], *Levaditi* und *Mitarbeiter* [10], *Tulasne* [18] bzw. *Pulvertaft* [13] und in Ungarn auch *Juhász* [5]. Es muss jedoch erwähnt werden, dass die Bakterien ähnliche Veränderungen auch unter den verschiedensten ungünstigen Umstanden zeigen können *(Hadley* und Mitarbeiter [3], *Klieneberger—Nobel* [7] bzw. *Kalina* [6]), ja, einzelne Bakterien (z. B. der Proteus OX_{19}) unter normalen Züchtungsverhältnissen *(Stempen* und *Hutchinson* [15]).

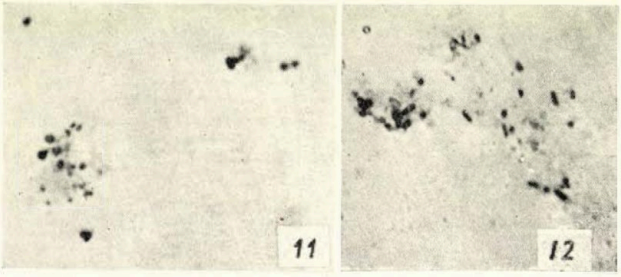


Abb. 11—12. Am 7. Tage der Inkubation Wachstum aufweisende Bakterienzellen aus dem Seitz-Filtrat des in der Kultur des *Sporotrichon*-Pilzes gebildeten Bakteriensediments *(E. coli)*. Bildung von kugel- und stäbchenförmigen Bakterien verschiedener Grösse ist ersichtlich. Am 8. Tage der Inkubation erwies sich diese Kultur als Reinkultur von *E. coli*. 1200 : 1. Dubosq-Brasil-Bouin-Fixierung, Giemsa-Färbung

Die im Zusammenhang mit dem Filtrieren auftauchende Frage, nämlich, ob es sich um verzögertes Wachstum der kleinen Bakterienzellen oder um Zellregeneration der Bakteriennukleoproteine handelt, trachten wir durch weitere elektronenmikroskopische und an Gradokolmembranen ausgeführte Filtrationen, sowie durch andere Versuche anzunähern. Richtunggebende wichtige Angaben sind bereits jetzt vorhanden, namentlich, dass der kleinkörnige Zerfall der gigantischen Bakterienzellen oft zu sehen ist, ferner, dass sich in dem, in die inkubierten Nährböden geimpften Filtratmaterial eine gewisse Gradualität der Stäbchenbildung zeigt. — Die in Bakterienkulturen, unter ungünstigen Umständen zustande kommenden gigantischen Gebilde werden in der älteren Literatur als Involutionsformen oder als von aussen in die Kultur gelangte bakterienzerstörende Protozoen (sog. «*Pettenkoferien*») beschrieben [9, 14]. Neuerdings werden diese Gebilde Evolutions- oder generative Bakterienformen genannt [21], weil gewisse Zeichen darauf hinweisen, dass

sich von den elementaren Bestandteilen der Zellen neue Zellen bilden können (11). In den angeschwollenen Bakterienzellen bilden sich regenerationsfähige filtrierbare Körner, die das Leben der Zelle bewahren und die Rasse aufrechterhalten — schreibt *Krasilnikow* [8] im Jahre 1954.

Die Beobachtung, dass in alten Pilzkulturen die eingeimpften Bakterien, im Gegensatz zu den in junge Pilzkulturen geimpften Bakterien, selbst keine anfängliche Vermehrung zeigen, weist darauf hin, dass sich die antibakterielle Eigenschaft mit dem Alter der Pilzkulturen entwickelte und dass sie bei den vorliegenden Versuchen *nicht* der Zusammenzüchtung mit Bakterien zugeschrieben werden kann ; wir können jedoch nicht wissen, mit welchen Mikroben die antibakteriellen Pilze, vor ihrer Züchtung, in der Natur im Zusammenhang standen.

Zusammenfassung

1. Das Verhältnis der zusammen gezüchteten Bakterien und nichtantibiotischen Pilze kann in drei Weisen verlaufen : einige Pilze bzw. Aktinomyzeten gehen zugrunde, andere Pilze hingegen sind mit Bakterien zusammen züchtbar ; eine dritte Gruppe von Pilzen befreit sich früher oder später von den in ihre Kultur geimpften Bakterien.

2. Wahrscheinlich existieren auch mit den üblichen Methoden nicht nachweisbare, sich schnell zersetzende antibiotische Stoffe ; diese üben durch ihre kontinuierliche Neubildung ihre Wirkung aus.

3. Es gelang nicht, bei den mit Bakterien zusammen gezüchteten Pilzen neu erworbene antibiotikumerzeugende Fähigkeit nachzuweisen.

4. Einige in Pilzkulturen geimpfter Bakterien schwellen an und zerfallen in kleine Körner; aus dem Seitz EK-Filtrat solcher Bakterienkulturen konnten wir die ursprüngliche Bakterienkultur zurückgewinnen.

LITERATUR

1. *Dienes, L., Weinberger, H. J.* : Bact. Rev. **15,** 245 (1951).
2. *Гаузе, Г.*: Лекции по антибиотикам. АМН СССР 1953.
3. *Hadley, P., Delves, E., Klimek, G.* : J. infect. Dis. **48,** 1 (1931).
4. *Имшенецкий, А.*: Вюлл. эксп. биол. мед., 5. (1947) (zit.: Токин).
5. *Juhász, I.* : Acta Physiol. Hung. **5,** 263 (1954).
6. *Калина, Г. П.* : Изменчивость патогенных микроорганизмов. УКРМЕДГИЗ. Киев, 1949.
7. *Klieneberger-Nobel, E.* : Bact. Rev. **15,** 77 (1951).
8. *Красильников, Н. А.*, Усп. совр. биос. *37*, 1. (1954).
9. *Kuhn, P., Sternberg, K.* : Zbl. Bakt. I. Orig. **121,** 113 (1931).
10. *Levaditi, C., Vaisman, A., Henry-Eveno, V., Veillet, J., Sandor, Th.* : Le chloramphénicol. Baillière Paris 1951.
11. *Löhnis, F.* : Zbl. Bakt. II. Orig. **56,** 23 (1922).
12. Manual of Determinative Bacteriology. Ed. : *Bergey, D. H.* ; 6th ed. Baltimore, 1948.
13. *Pulvertaft, R. J. V.* : J. Path. Bact. **65,** 175 (1953).
14. *Preisz, H.* : Zbl. Bakt. I. Orig. **139,** 225 (1937).

15. *Stempen, H., Hutchinson, W. G.:* J. Bact. **61,** 321 und 337 (1951).
16. *Стрешинский, О. М.:* zit: Гаузе.
17. *Токин, Б. П.:* Фитонциды. АМН СССР, Москва, 1951.
18. *Tulasne, R.:* C. r. Soc. Biol. **143,** 286 (1949). — Nature **164,** 876 (1949).
19. *Василенко, А. Г.:* zit.: Гаузе
20. *Waksman, S. A.:* Microbial Antagonism and Antibiotic Substances. New York. Commonwealth. 1947.
21. *Жолкевич, А. Я.,* Усп. совр. биол., **33,** 101 (1952).

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НЕАНТИБИОТИЧЕСКИХ ГРИБКОВ И БАКТЕРИЙ

Й. Шинкович

Р е з ю м е

В результате проведенных опытов автор пришел к четырем выводам:

1. При совместном выращивании бактерий и неантибиотических грибков наблюдаются три исхода: определенные расы грибков погибают, другие расы продолжает существовать в биоценозе с бактериями, а третья группа грибков освобождается от посеянных в культуру бактерий.

2. Предполагается существование также и антибиотических, быстро разлагающихся веществ, не выявляющихся путем обычных методов. Вещества эти оказывают влияние посредством их беспрерывного новообразования.

3. Не удалось установить, приобретают ли выращиваемые совместно с бактериями грибки способность произведения антибиотиков.

4. Некоторые — посеянные в культуры грибков — бактерии разбухают и распадаются на мелкие частицы. Пропустив таковые через фильтр Зейтца, из фильтрата удается получать исходную культуру бактерий.

A NEW BACTERIAL DISEASE OF RICE CAUSED BY PSEUDOMONAS ORYZICOLA N. SP.*

By

Z. KLEMENT

Research Institute of Plant Protection, Budapest

(Received June 20, 1954)

In Hungary, very serious loss is incurred in some years by the «bruzone» disease of rice. Experiments in progress since 1949 show that there are two pathogenic agents to be taken into account in this country. One is the fungus *Piricularia oryzae Cav.* [2], the other a new pathogenic bacterium, hitherto unknown in the literature, for which on the basis of the description which follows below, I suggest the name *Pseudomonas oryzicola n. sp.* The present paper is devoted solely to this new pathogenic bacterium.

Relatively few data can be found in the literature concerning bacterial disease of rice. Up to now there have been two definitely established pathogenic agents : *Pseudomonas (Xanthomonas) oryzae Uyeda et Ishiyama* [7], the causative agent of leaf-spot disease, inflicts greater loss ; *Pseudomonas (Xanthomonas) itoana Tochinai* [6] is the cause of black rot of rice. Both these have been described from Japan. Although bacterial disease of rice occurs elsewhere too, their causative agents have not been identified satisfactorily [8]. From Java a bacterial disease called «Kresek» had been described [3], for which a more closely not determined Xanthomonas species is held responsible. *Vzorov* [1], in the Soviet Union, claims that the bacteria grown pure by him from rice should be treated as a new variant. In 1941, *Szirmai* [4, 5] described a rice bacteriosis, the symptoms of which agreed with those of the new disease now studied. By investigation extending over a large field, he proved the primary role played in the disease by a bacterium, which for the lack of proper equipment he was unable to identify in those days.

Symptoms

The causative agent of bacterial bruzone attacks the leaves sheathing the panicles ; it also invades the stems, the nodes, the panicle, the rice seeds, and, in exceptional cases, the leaves. The disease most frequently reveals itself

* Name applied in accordance with the rules of the International Code of Nomenclature.

before the ears are put forth, with the panicles still within the sheaths. On the leaves sheathing the panicles of attacked plants there first appear dark, greyish-green, blurred spots, which turn brown, later reddish-brown, then black, and finally dry up and die at a slow pace depending on the vapour content of the air.

The panicles emerging from the sheaths become infected (Fig. 1). The husks turn brown, the seeds remain idle. Infected panicles and seeds, respectively, were also observed in perfectly normal green plants when the time the ears were put forth was followed by a vaporous atmosphere, wet and windy weather, favourable to the large-scale spread of bacteria (Fig. 2). In such cases, if the infection reached them during inflorescence, the panicles remained idle (Fig. 3). If the infection occurred after the seeds had set, the panicles matured but yielded worthless, small-sized, discoloured grains.

The disease was also noticed to spread down the stem where blurred spots similar to those on the leaf sheaths were seen (Fig. 4). However, they never extended below the first or second node from the top. These nodes turned likewise dark-brown or blackish.

In one instance, necrosis departing from the tips of the leaves was observed to extend downwards, chiefly along the leaf veins.

In histological examinations contrast staining according to *Stoughten* was used. The sections were stained with thionine blue followed by orange G. With this method bacteria stain dark blue, the cellulose cell walls yellow or green, and the woody tissues a pale blue. The examinations revealed that the bacterium spreads in the bundle sheath of the vascular vessels (Figs. 5 and 6), and that it does not penetrate the vessels.

Material

Bacterial bruzone, less significant than piricular bruzone, was found to occur in most of the rice-plantations of Hungary. In 1953, it was particularly wide-spread in the rice fields between the Danube and the Tisza, where the proportion of infected plants had reached as much as 40 per cent. Isolation of the bacterium had been made from several hundred plants, but only the following strains were included in our experiments.

Strain A 012 isolated from leaf sheathing panicle of planted Dunghan Shali rice from Szarvas.
Strain A 031, isolated from drying-up leaf tip of Dunghan Shali from Szarvas.
Strain A 041, isolated from drying-up leaf tip of Dunghan Shali from Szarvas.
Strain A 061, isolated from stem turned brown of Arpa Shali from Hódmezővásárhely.
Strain A 071, isolated from leaf sheath of Dunghan Shali from Szarvas.
Strain A 081, isolated from top node of Dunghan Shali from Szarvas.
Strain A 082, isolated from stem below top node of Dunghan Shali from Szarvas.
Strain A 084, isolated from top node of Arpa Shali from Szarvas.
Strain A 091, isolated from second node turned brown of Dunghan Shali from Szarvas.
Strain A 111, isolated from young seed turned brown of Dunghan Shali from Szarvas.

Isolation and identification of the pathogenic agent

On the slides, only about 5 to 10 per cent of the bacteria proved to be pathogenic and were frequently accompanied by yellow colonies of saprophytic bacteria.

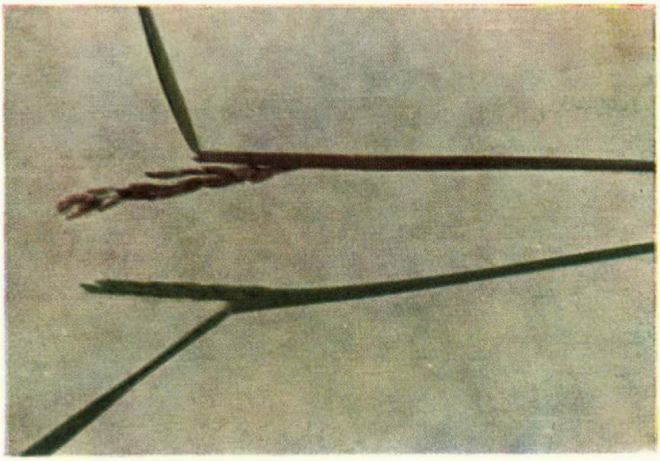


Fig. 1. Panicle emerging from infected sheath. (Left, normal plant)

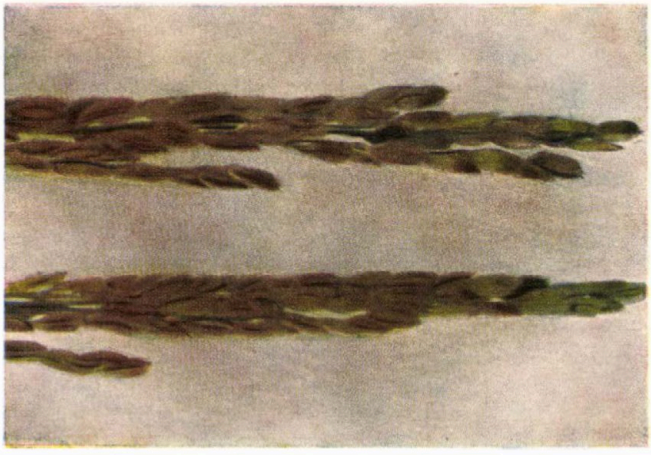


Fig. 2. Infected panicles turning brown

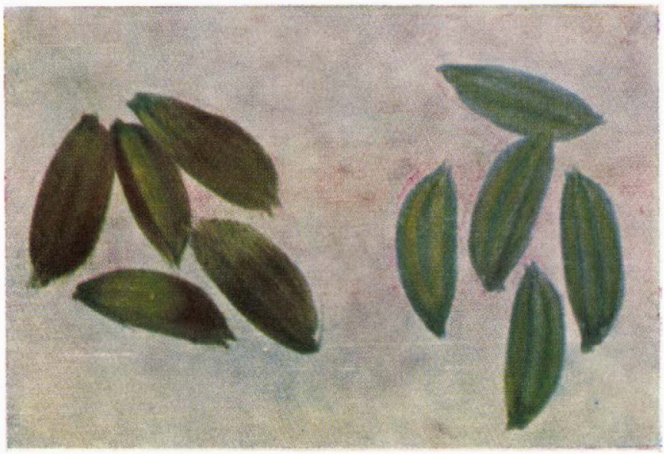


Fig. 3. Infected rice seeds. Right, normally developing rice seeds

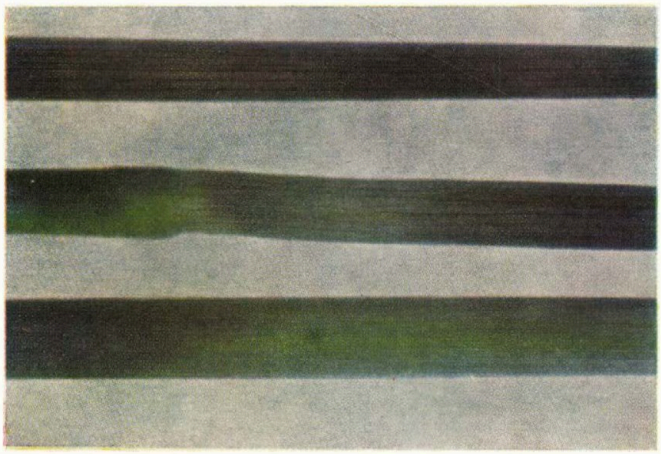


Fig. 4. Bacterial browning on stem

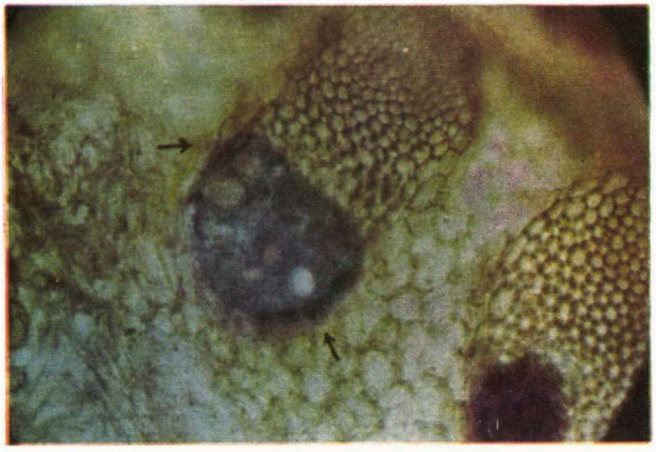


Fig. 5. Bundle sheath attacked by bacteria. (Infected cells are bluish violet)

Fig. 6. Bacteria-infected bundle sheath (longitudinal section)

Under the microscope, rod-shaped bacteria of relatively small size were visible, measuring 2,5 to 3,5 by 1,3 μ. The poles of the rods were blunt, in some cases slightly bent. The bacteria were motile by means of 1 to 3 polar flagellae (Figs. 7, 8). In the visual field they appeared single or in twos. They did not form neither chains, nor spores. They were Gram-negative, and Ziehl—Neelsen-negative.

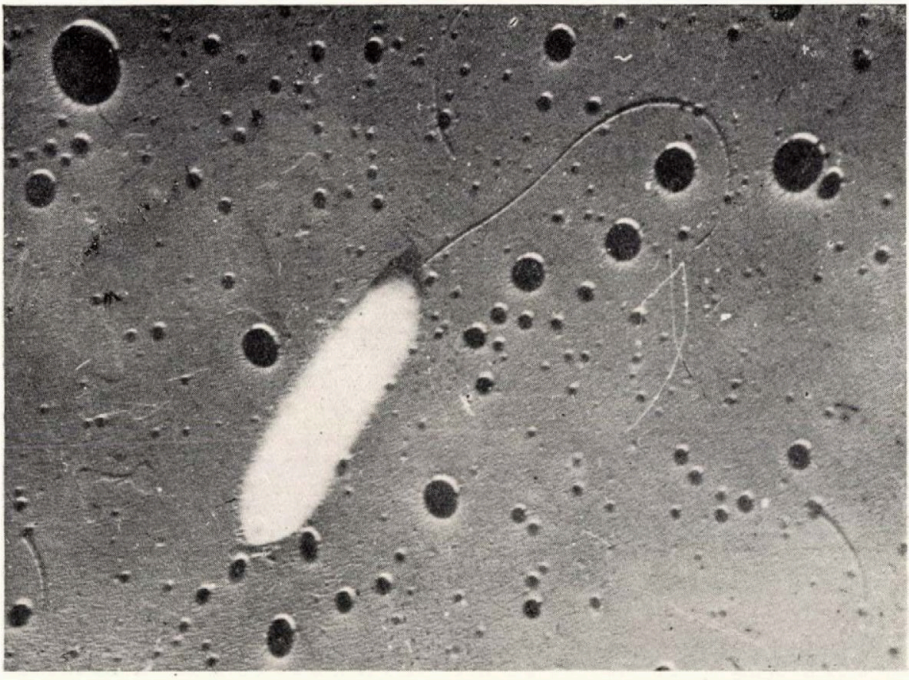


Fig. 7. Ps. oryzicola with blunt ends and one polar flagellum (magn. 11,220). (Courtesy of the electron microscopical laboratory of the Hungarian Academy of Sciences)

In agar broth, the colonies were found to appear on the second or third day of incubation at 25° C. They were annular in shape, relatively small, with a diameter of 1 to 2 mm. At the beginning, they were bulging and had intact margins. Later, the protuberance in the middle became more marked and the margins translucent. When transilluminated, the centre exhibited a bluish-green iridescence. Looked at through a magnifying glass, when light was passed through the colonies their inner structure was seen to be threadlike and granular (Fig. 9). With time, the margins of the colonies became serrated (Fig. 10). In slant agar the culture grew considerably in the days following isolation ; it was opalescent white and iridescent, but one week later lost its colour and became perfectly translucent. A characteristic feature was

that in broth-agar, sterilized for a short time, it produced green fluorescent pigment. In culture media, sterilized more than once or for a longer period, secretion of fluorescent material was slight or not perceptible at all. The organisms grew in surface cultures only.

In broth, a slight uniform turbidity showed on the third day, and a small amount of precipitate formed on the fifth. The precipitate, when shaken, stayed

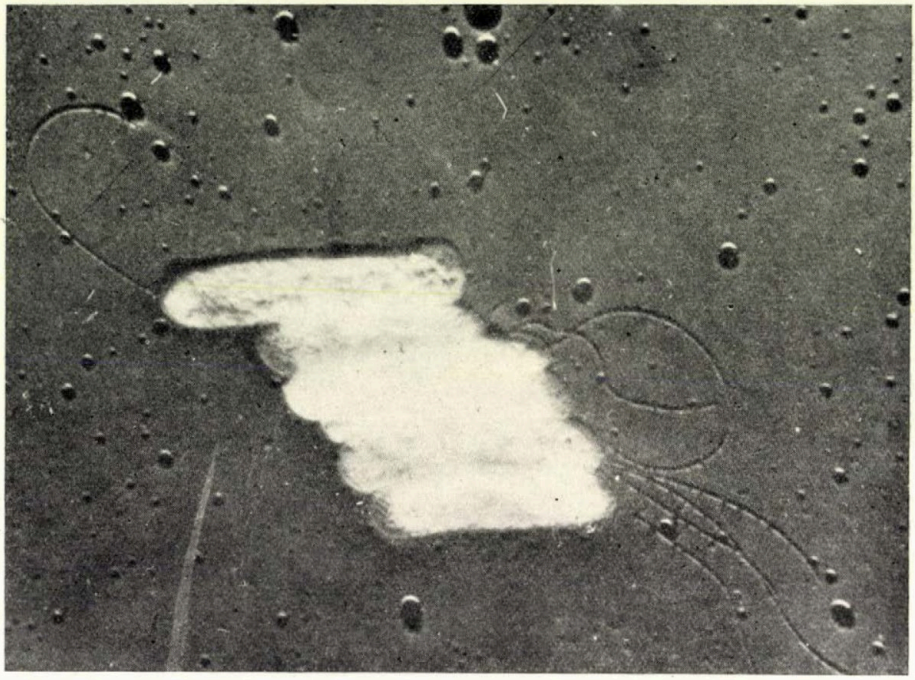


Fig. 8. Three-hour microcolony of *Ps. oryzicola* (magn. 11,220). (Courtesy of the electron microscopical laboratory of the Hungarian Academy of Sciences)

together threadlike, displaying a spiral motion. After the fifth or sixth day, a delicate fragmented membrane was formed on the surface, which sank to the bottom on mild shaking. A green fluorescent colour was taken on by the broth.

The culture grew well on a blood agar plate. Greyish-white smooth colonies developed in 48 hours. Under the colonies, haemopepsis was observable, the blood turning slightly light in colour.

On sterilized potato blocks, growth in the 48th hour following inoculation was moderately marked, whitish of a somewhat creamy hue, shining, and liquid.

In stab cultures the gelatine was liquified on the third day in the shape of a funnellike depression. In gelatine tubes liquefaction was complete after the second week. In the strains A 111 and A 071 liquefaction was a slower process.

In litmus milk, peptonisation began after the 48th hour without coagulation, the colour changing to slight pink. In some cultures peptonisation was complete by the fifth day. The litmus became reduced. Lactose and lactalbumen were not utilized, but glucose and caseinogen, present in small amounts, were split.

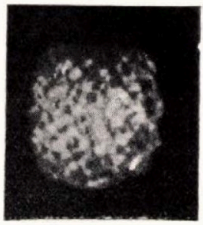


Fig. 9. Twentyfour-hour, transilluminated, iridescent, threadlike and granular colony of *Ps. oryzicola*

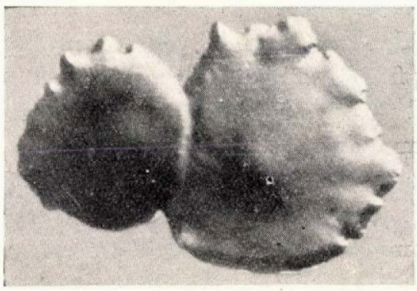


Fig. 10. Ps. oryzicola colonies on the sixth day, illuminated from above

The behaviour of the bacterium strains on various sugars were observed for 25 days. Decomposition was studied in 16 different sugars and sugarlike alcohols, respectively, using peptone water with the *Andrade* indicator and synthetic basal media. The results are shown in the following table referring to strain A 021.

It can be read off from this table that while glucose, galactose, arabinose, xylose, saccharose, and mannose were used well by the bacteria, they made little use of levulose and raffinose on synthetic basal media, and none at all of lactose, maltose, dextrin, inulin, mannitol, asparagine, and glycerin. In none of the tubes was gas-formation observable.

On starch agar plates, no starch hydrolysis was evidenced, not even on the fifth day.

In synthetic nitrate media, nitrate was not reduced to nitrite.

Indole formation was noticed in none of the strains, not even after the 14th day.

Table I

Biochemical activity of Ps. oryzicola

	Nutrient solution	Glucose	Levulose	Galactose	Arabinose	Xylose	Lactose	Raffinose	Saccharose	Maltose	Mannose	Dextrin	Dulcite	Mannitol	Asparagin	Glycerin
Synthetic	4 days	+	—	++	+	+	—	—	±	—	—	—	—	—	—	—
	6 days	+	—	++	++	++	—	—	++	—	±	—	—	—	—	—
	12 days	++	±	++	++	++	—	±	++	—	++	—	—	—	—	—
	22 days	++	+	++	++	++	—	++	++	—	++	—	—	—	—	—
Peptone water	4 days	+	—	++	++	++	—	—	+	—	+	—	—	—	—	—
	6 days	±	—	++	++	++	—	—	+	—	+	—	—	—	—	—
	12 days	—	—	++	++	++	—	—	+	—	+	—	—	—	—	—
	22 days	—	—	++	++	++	—	—	++	—	++	—	—	—	—	—

Symbols: — no acid formation; ± slight acid formation; + moderate acid formation; ++ marked acid formation.

Hydrogen sulphide formation in tubes containing peptone water was studied by means of filter paperstrips impregnated with lead acetate. Not even after 13 days did the strips yield a H_2S reaction.

Production of ammonia was tested in peptone water. On the fifth day, ammonia was found to be formed in cultures A 081, A 082, A 091, and A 111. On the twelfth day, its presence could be demonstrated in all of the cultures.

The optimum temperature for growth ranged between 25° and 28° C.

Artificial infection experiments

The infection experiments were mostly carried out under glass and in the field, in concrete basins. The temperature in the greenhouse varied from 24° to 30° C, at relative vapour contents between 80 and 90 per cent. The rice varieties Dunghan Shali and Arpa Shali were used for inoculations.

Inoculations were made at different developmental stages of the plants, viz. 1. before developing the stem; 2. before heading, with the panicle still sheathed; 3. during heading, at flowering; 4. immediately after flowering; 5. 10 days following flowering.

A sterile physiological suspension in water of 48 to 72-hour broth agar cultures was used for the infections. This was adjusted to the IV. Brown-grade. Two methods were employed in producing the disease artificially, spraying, and injection, by means of an ordinary hypodermic syringe. The infections were carried out with the above enumerated strains of the bacterium.

1. Young rice plants, just about to shoot their stems, were only sprayed. They revealed no symptoms of the disease.

2. 0,2 ml of the bacterial suspension were injected with a hypodermic

needle under the leaf sheaths of plants in the stage before heading, taking good care not to injure the leaves sheathing the panicles. Signs of the disease became visible on the second or third day, at temperatures from 24° to 30° C. At lower temperatures incubation took sometimes as much as a week. All injected plants developed disease. When sprayed over the plants, the suspension elicited no symptoms of the disease.

3. During heading, while flowering, spraying was applied for inducing infection. Test tubes turned upside down were drawn over the control panicles to protect them against the suspension spray. The symptoms appeared on the panicles in 36 hours. The seeds changed colour to greyish-green, olive, then brown. From 60 to 90 per cent of the grains turned brown. The flower parts, too, became brown and necrotized, thus, for lack of fertilization, the seeds remained idle.

4. In another experiment the plants were infected immediately after flowering. Again, the seeds turned brown, but not all of them perished. Those that survived shrivelled and remained small.

5. In plants infected 10 days after flowering the grains turned brown but survived, lagging behind in development and attaining a stage of forced maturity.

The experiments revealed that while the emerging tender rudimentary seeds were the most sensitive to infection, the panicles remained infectible up to the time of ripening. It has been mentioned above that in rice about to head, with the panicles still sheathed, we failed to elicit the disease by spraying. This negative result is probably due to the fact that the water drops carrying the bacteria trickle off the waxen leaf and stem, whereas by the delicate pubescence on the seed they are retained, thus rendering infection easily possible. This also appears to explain why the panicles turn brown and remain idle in otherwise healthy green rice plants.

The experimental infections carried out in the field rendered support to those made under glass, the only difference being that there were discrepancies in the incubation times, dependent on temperature.

It was in each case possible to re-isolate the inoculated pathogenic agent.

These infections appeared to confirm the pathogenic character of the bacterium described.

Comparison of the condition discovered in Hungary with the two bacterial diseases of rice described abroad

Since the two pathogenic bacteria of rice, which have been described abroad, are not known to have occurred in this country, the new bacterium described by us can only be compared with them on the basis of literary data.

The comparable morphological, physiological and biochemical characters can be tabulated as follows.

Table II

Morphological and biochemical characters of the three pathogenic bacteria of rice

Name of pathogenic agent	Colony	Size	Gram's staining	Acid resistance	Gelatin liquefaction	Nitrate reduction	Starch hydrolysis	Sugar decomposition: Glucose	Levulose	Galactose	Arabinose	Xylose	Lactose	Raffinose	Saccharose	Maltose	Mannose	Dextrin	Inulin	Dulcite	Mannitol	Asparagin	Glycerin	Indole test	Ammonia	Hydrogen sulphide	Milk: Coagulated	Peptonized	Litmus reduction	Remarks
Xanthomonas oryzae	wax yellow	0,5—0,8 × 1,2—2,0	—		—	—		+					+		+									—	—	+	—	+	+	
Pseudomonas oryzicola	white, opalescent	1,3 × 2,5—3,5	—	—	+	—	—	+	±	+	+	+	—	±	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	+	+	Green fluorescent pigment formed in nutrient medium
Xanthomonas itoana	yellow	0,5—0,8 × 1,2—3,0	—		—	+	—	—					—		—									+	—		+	—	—	

The new bacterium differs from the other two in respect of fundamental characteristics. The colonies of *Xanthomonas oryzae* and *Xanthomonas itoana* are yellow, while those of the new bacterium are white, opalescent. There are essential differences in liquefaction of gelatin, reduction of nitrate, production of ammonia, formation of hydrogensulphide and indole, action in litmus milk and sugar-decomposition. Another basic difference is that the new bacterium gives rise to a green fluorescent pigment in the nutrient medium ; a fact which excludes it belonging to the genus *Xanthomonas*.

It appears from the above that we have found a hitherto undescribed pathogenic agent, which by its capacity to form green fluorescent pigment must be listed with the genus *Pseudomonas*. On this basis, I venture to suggest the name *Pseudomonas oryzicola* for this rice bacterium.

Summary

A new bacterial disease of rice has been discovered in Hungary, causing severe damage in some years. Morphological, biochemical, and physiological examinations of the bacterium seem to prove that the agent is a hitherto undescribed bacterium, for which we suggest the name *Pseudomonas oryzicola n. sp.*

The pathogenic nature of the bacterium has been proved by artificial infections. The agent attacks the leaves sheathing the panicles ; it also invades the stems, the nodes, and the panicle itself. Some plants perish prior to putting forth ears. The grains in the attacked panicles turn brown, then blacken, and become idle. The bacterium spreads bundle sheaths.

The pathogenic bacteria are rods with blunt ends, 2,5 to 3,5 · 1,3 μ in size, moving by 1 to 3 flagellae. They form no chains, and are non-sporing. They are Gram-negative and Ziehl—Neelsen-negative. At first, the colony is ring-shaped, but later becomes undulatory. It is opalescent white, 1 to 2 mm in diameter, and bulges in the middle. Its inner structure is threadlike, granular, exhibiting iridescence on transillumination. It produces a green fluorescent pigment in the culture medium. On the surface of broth it forms a delicate membrane. It grows well on potato blocks. It markedly liquifies gelatin. It changes the colour of litmus-milk to a slight pink, and peptonizes and reduces the litmus. It forms acid without gas formation from glucose, galactose, arabinose, xylose, saccharose, mannose, and to a slight degree from levulose and raffinose. It forms no acid from lactose, maltose, dextrin, inulin, dulcite, asparagin, and glycerin. It does not hydrolyse starch, or reduce nitrate to nitrite. Indole and hydrogen sulphide are not formed upon the action of these bacteria, but there develops ammonia in the culture. The optimum temperature for growth ranges from 25° to 28° C.

According to symptomatological, morphological, physiological and biochemical examinations, the agent cannot be identified with Xanthomonas oryzae or Xanthomonas itoana.

LITERATURE

1. *Израильский В. П.:* Бактериальные болезни растений (Bacterial diseases of plants. — Hungarian only) Moscow, 1952, pp. 134—35.
2. *Podhradszky, J.:* Növényvédelem időszerű kérdései 1, 1 (1954).
3. *Reitama, J. & Schure, P. S. I.:* Contr. gen. agric. Res. Sta. Bogor **117,** 17 (1950). Ref.: R. A. M. **30,** 539 (1951).
4. *Szirmai, J.:* Mezőgazdasági Tudományos Közlemények 125 (1950).
5. *Szirmai, J.:* Acta Agronomica 160 (1950).
6. *Tochinai:* Ann. Phytopath. Soc., Japan **2,** 453 (1932).
7. *Ujeda & Ishiyama:* Mitteil. Kaiserl. Centralb. Landw. Versuchsst., Tokyo, **45,** 233—261 (1922). — Abstr. Bacter. 9, 55.
8. *Voglino:* Ztschr. Pflanzenkrankheiten **15,** 356 (1905).

НОВАЯ БАКТЕРИАЛЬНАЯ БОЛЕЗНЬ РИСА

PSEUDOMONAS ORYZICOLA N. SP.

З. Клемент

Р е з ю м е

Автор обнаружил в Венгрии новое бактериальное заболевание риса, причиняющее в некоторых годах большие ущербы. На основании морфологических, биохимических и физиологических исследований доказано, что приходится считаться с новым возбудителем болезни, которому автор предлагает присвоить наименование Pseudomonas oryzicola.

Путем экспериментальных заражений автор доказал патогенность бактерии. Возбудитель поражает — еще до выметывания — влагалищные листья, покрывающие метелку риса, стебель и узлы, а также и метелку. Пораженные метелки ржавеют, чернеют, семена становятся пустыми. Некоторые растения погибают еще до выметывания. Бактерии размножаются в эндодермах дыхальцев растений.

Бактерии имеют форму палочек с закругленными концами, размерами 0,73—1,59×0,36—0,48 микронов, они подвижны, располагаются единично или попарно, цепи они не образуют и бесспоровы. Грамоотрицательны, не окрашиваются по Циль-Нильсену. Форма колоний вначале круглообразна, позже слабо-волниста, диаметром в 1—2 мм, опалового белого цвета, середина колонии выпуклая. Внутренняя структура нитчатая, зернистая, при просветлении иризирует. В питательной среде эти бактерии производят зеленую флюоресцирующую краску. На поверхности бульона образуют нежную пленку. Хорошо культивируются на картофеле. В сильной степени разжижают желатин. Цвет лакмусового молока превращают в бледно-розовый, пептонизируют молоко и разлагают лакмус. Образуют кислоту без выделения газа из глюкозы, галактозы, арабинозы, ксилозы, сахаринозы, маннозы, в меньшей мере из левулозы и рафинозы. Не образуют кислоты из лактозы, мальтозы, декстрина, инулина, дульцита, маннита, аспарагина и глицерина. Не гидролизуют крахмала, не образуют из нитрата нитрит. Не производится индол и сероводород. В культурах образуется аммиак. Оптимальная температура 25—28 C°.

На основании симптоматологических, морфологических, физиологических и биохимических исследований, автор установил, что данные бактерии не тождественны Xanthomonas oryzae и Xanthomonas itoana.

OBSERVATIONS ON LYSOGENESIS IN B. MEGATERIUM AND ON MEGACINE, THE ANTIBACTERIAL PRINCIPLE OF THIS BACILLUS SPECIES

By

G. IVÁNOVICS and L. ALFÖLDI

Institute of Microbiology, Medical University, Szeged

(Received August 2, 1954)

In studying lysogenesis in B. megaterium, our attention has been focussed upon strains isolated from soil, animal excrements and air. At the same time experiments were carried out with standard lysogenic strains well-known in the literature. We observed that some of the strains isolated produced an antibacterial principle. In this respect, two of our strains displayed a particularly remarkable behaviour in that their fresh cultures lysed on the action of a small dose of ultraviolet light, and the resulting lysate exerted a more or less intense antibacterial effect on B. megaterium strains. It was found that the antibacterial principle was not a phage, but should be regarded as a substance of protein character as yet largely undefined. We suggested to term it megacine [1]. In the present paper we shall discuss our observations in detail.

Material and methods

B. megaterium strains. The strains isolated were identified on the basis of their morphological and cultural characteristics [2, 3]. In addition, serological studies [4, 5] were made for the presence of D-glutamylpolypeptide [6]. The strains were isolated in the course of recent years, and have been maintained by monthly transfer on horse-meat peptone agar. Besides, suspensions of their washed spores have been stored in the frozen state in order to exclude any potential changes of the strains.

Sixteen of the strains have been studied for years for their cultural qualities and antigenic structure. The pertaining observations will be published elsewhere.

The strain labelled NRRL B-938 was kindly supplied by *C. W. Hesseltine* (Peoria). The following standard laboratory strains of B. megaterium were utilized: the «mutilate» and lysogenic strains 899 [1], both sent us most kindly by professor *A. Lwoff* (Paris); strain 899, a sporogenous and lysogenic one, and strains 899 IId and 7—0—11, both lysogenic, were received from the collection of *H. J. Welshimer* (Richmond), to whom we are greatly indebted. In this paper the latter strains are marked by the letter «W» in distinction from the others.

Media. Besides horse-meat peptone agar, a considerable number of different media were used. Of these only those will be mentioned which yielded invariably reproducible results. The yeast extracts employed in nutrient media were prepared by acid or neutral extraction.

The «acid» extract of baker's yeast was prepared as described by *Lwoff* and *Gutman* [8]. The «neutral» yeast extract was made as follows: 2 kg of baker's yeast were suspended in 8 litres of tap water, then autoclaved at 110° C for 30 minutes. The supernatant obtained after sedimentation was made to pass through an asbestos filter.

Acid hydrolysate of casein: 100 g of technical casein of good quality were suspended in 500 ml of 20 per cent hydrochloric acid and heated on a sand bath for 24 hours. The hydrochloric acid was distilled in vacuum, the remains dissolved in 200 ml of water, adjusted with N NaOH

to pH 3,4, and the volume made up to 1 litre with distilled water. The hot solution was repeatedly treated with Norit until it turned perfectly colourless after filtration. The hydrolysate was kept under toluol at room temperature.

YC medium: To every 100 ml of «acid» yeast extract 50 ml of acid hydrolysed casein solution and 20 ml of M/15 Soerensen phosphate buffer solution of pH 7,2 were added and made up to 1 litre with water. The pH was adjusted to 7,2.

YP medium. In 200 ml of «neutral» yeast extract 10 g of Witte's peptone were dissolved and the volume made up to 1 litre. The pH was adjusted to 7,2.

Medium 9. In 200 ml of «neutral» yeast extract 5 g of enzyme hydrolysed casein, the commercial *Protolysate* (Mead Johnson & Co.), were dissolved. The volume was made up to 1 litre and the pH adjusted to 7,2. The agar media were prepared by adding 15 g of agar to each litre of the liquid media described above.

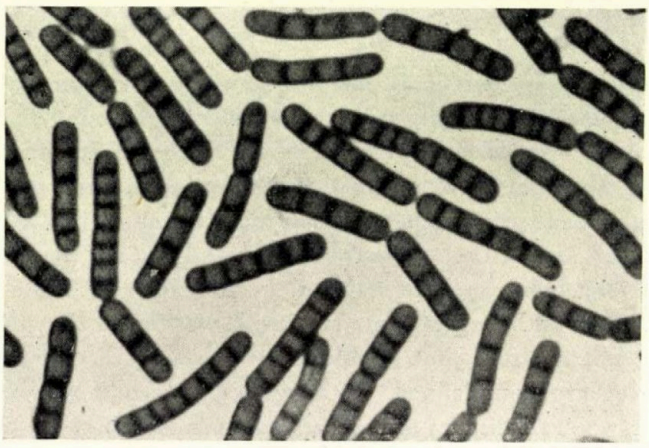


Fig. 1. Stained preparation of 10-hour culture of B. megaterium strain 213 obtained in medium 9. (Stained according to Gutstein with methylene violet after mordanting with tannic acid. Completely intact multicellular rods)

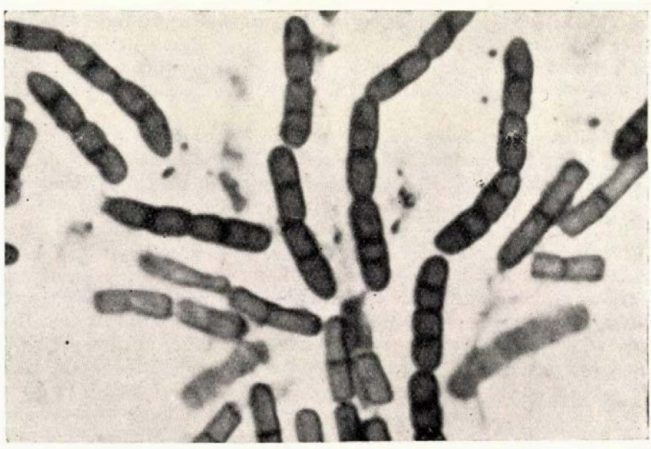


Fig. 2. Stained preparation of culture of B. megaterium strain 216. (Gutstein's staining. Besides intact rods with distinct cellular outlines, there are a great number of more or less desintegrated organisms with unstained cellular walls)

Preparation of bacterial cultures and estimation of their growth. Cultures prepared in liquid media were invariably aerated by shaking. Erlenmeyer flasks were used in preparing the cultures. A 10 cm long sealed glass tube 14,5 to 14,7 mm in diameter was fused slightly inclined onto the side of each flask. On tilting the flask part of the culture was taken up by the tube. The tube fitted into the corresponding recipient of our optical densimeter so that the growth of the culture could be easily checked in every period. Not more than 20 ml of medium were filled in each 100 ml flasks.

An electromagnetic shaker performing 110 oscillations per minute at an amplitude of 3 cm was used in aerating the cultures, at a temperature of 34° to 35° C.

In measuring culture growth, an «Orifot» microphotometer with a photoelectric vacuum cell was employed. A frontal extension was constructed to this apparatus to hold the tubes fused onto the flasks, or test tubes of an equal diameter. Measurements were carried out in monochromatic light by applying an orange colour filter. Optical density, expressing the density of the

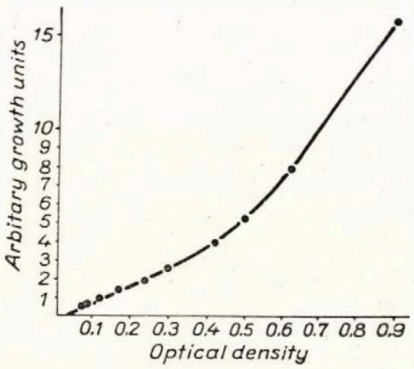


Fig. 3. Calibration curve plotted on the basis of an approximately 10-hour culture of B. megaterium strain 213

bacterial suspension, is determined by the logarithmic value of the ratio between incident light and light that passed through. Up to values of 0,350 to 0,400 the optical density of the culture follows the Beer—Lambert's law. Beyond these values, the curve indicating growth deviates from the straight line. Since in a few exceptional cases some means had become necessary whereby to compare quantitative data concerning also some other properties of suspensions with optical density values exceeding above, a calibration curve of the B. megaterium suspension was prepared. An approximately 10-hour culture of B. megaterium strain 213 prepared in medium 9 was used in plotting this curve. Although in the course of the experiments reported below we worked chiefly with strains 119 and 216, for the purposes of the calibration curve we thought them less suitable than strain 213, because in their 8 to 10-hour cultures a considerable number of bacilli were observed to disintegrate spontaneously, whereas in equally old cultures of strain 213 apparently intact multicellular organisms characteristic of B. megaterium were found, consisting of 4 to 8 units (Figs. 1 and 2).

Fig. 3 shows the calibration curve plotted on the basis of varying dilutions of a culture of optical density 0,9 from strain 213.

The following procedure had been adopted in selecting the so-called «growth units» of arbitrary character shown on the ordinate. An 1 : 16 dilution of the culture of strain 213 with an optical density of 0,120 was plated on agar surface. It was found that 10^7/ml colonies developed of the diluted culture. This was regarded as the «growth unit». The «growth unit» values, which with the aid of the curve may be computed from the determined values of optical density, do not by any means represent in each case the actually prevailing conditions ; they, at the utmost, approximate them. Yet, although influenced by the extent of chain formation and the degree of cellular desintegration, the «growth unit» is still more characteristic of the growing bacterial culture than is optical density.

Source of ultraviolet light. A «Hanau» mercury lamp, factory number SR 300 M 197557 was used. Its performance data, as measured by I. Kecskeméty and L. Szalay, to whom our thanks are due, were found to be as follows. The energy passing in one sec through 1 cm^2 surface at 25 cm distance in the optical axis amounted to $7{,}3 \cdot 10^5$ erg, of which $3{,}3 \cdot 10^5$ erg fell to the spectral range below 3500 Å. The lamp was used without a filter, i. e., heterochromatic rays were applied in the course of experiments.

Experimental results

Lysogenicity of B. megaterium strains

Cultures obtained in YC medium by aeration for 10 to 16 hours were diluted to 0,300 optical density. Serial dilutions of 10^{-2}, 10^{-3}, etc. were prepared from the suspensions. The same medium was invariably used as a diluent. From similarly obtained cultures of the phage-sensitive «mutilate» strain a dilution of an optical density of 0,400 was prepared and 0,8 ml of this were added to 0,2 ml of each culture dilution tested. One ml of YC medium containing 1 per cent agar which had been melted and cooled to 60° C was added to these mixtures and layered on YC agar plates.

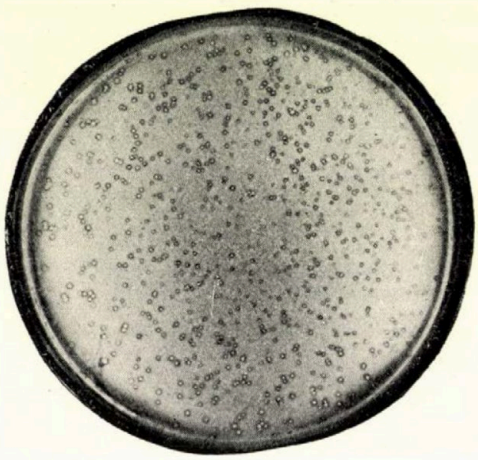


Fig. 4. Effect of strain 216 on growth of the «mutilate» strain (x0,5, approx.)

The standard lysogenic strains 899 [1], W899, W899 IId and W7-0-11 yielded without exception numerous isolated plaques. Apart from these phage colonies, plaques containing a central colony were frequently found. Of the 16 B. megaterium strains isolated by us, 15 have proved not lysogenic. A similar behaviour was displayed by the strain labelled NRRL B-938. One of our strains (strain 56) isolated from air yielded a considerable number of phage plaques.

Two of our strains, 119 and 216, behaved in a particularly remarkable manner. They had been isolated 2 or 3 years ago from soil samples and mouse faeces, respectively. On pouring a dilute suspension of strain 216 together with the «mutilate» suspension into a thin layer of agar the patterns shown in Figs. 4 and 5 were obtained.

It is striking that there are no plaques to be seen, whereas around the isolated colonies zones free of growth are visible everywhere. On identification

these colonies proved to be of strain 216. When the colonies surrounded by a zone, and their immediate environments, were removed, added to dilute «mutilate» suspension and then cultivated, there was no dissolution to be observed. On repeating the above experiment with the culture so obtained, a result identical with those just described was obtained.

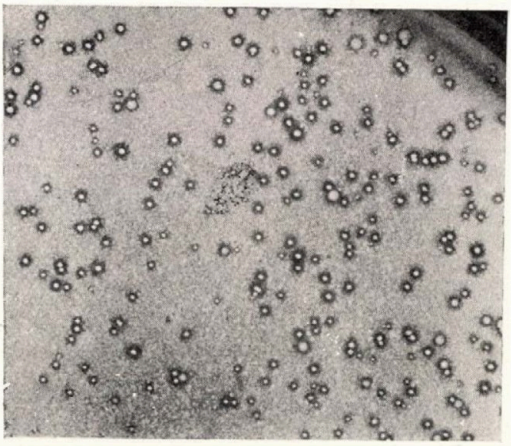


Fig. 5. A portion of Fig. 4 enlarged about 2,5 times

With a view to subjecting the phenomenon described to a closer study YC agar plates seeded with the «mutilate» were spotted with 0,03 ml of 8 to 16-hour YC cultures of various B. megaterium strains. Each culture was made in duplicate. Half of the plates was incubated at once, while the others were exposed to UV light from a distance of 45 cm, for 45 seconds before incubation. (Table I summarizes the behaviour displayed by our strains on plates not exposed to UV light.)

Table I

Behaviour of B. megaterium strains spotted onto surface of YC agar coated with «mutilate» strain

Characteristics of strain	Number of strains	Behaviour of colony at site of spots
Non-lysogenic	4	Giant colony with distinct margins without inhibition zone
Lysogenic	2	Giant colony with distinct margins without inhibition zone
Non-lysogenic	10	0,5 to 1,5 mm wide inhibition zone around giant colony with distinct margins
Lysogenic	2	0,5 to 1,5 mm wide inhibition zone around giant colony with distinct margins
Non-lysogenic	3	At least 2,5 to 3 mm wide inhibition zone surrounding giant colony with distinct margins

Quite conspicuous differences were observed on our plates ir radiated with UV light for short periods. They are shown in Figs. 6 and 7.

It attracts attention that no growth whatsoever is noticeable on the «mutilate» layer spotted with strains 119 and 216 and irradiated. Strain 299, on the other hand, although usually developing without a zone, can be seen to have become surrounded by a broad inhibition zone upon the effect of irradiation. Growth of the lysogenic strains — also of strain 899 — exposed to the effect of UV light differed in no way from that of non-irradiated cultures.

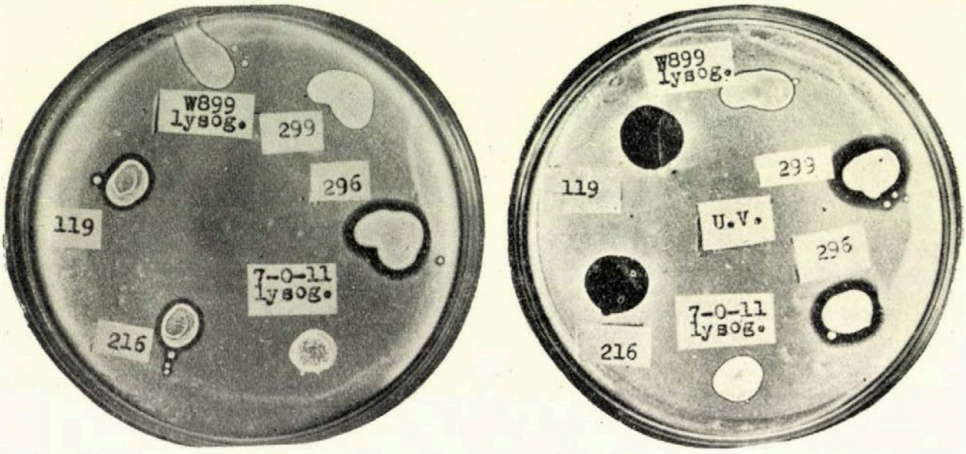


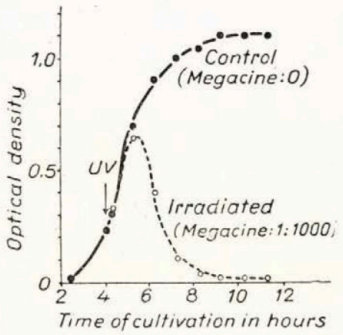
Fig. 6. Culture of different strains dripped on plate seeded with «mutilate». Not irradiated
Fig. 7. Culture of different strains dripped plate seeded with «mutilate». After irradiation

The growth-free agar areas of strain 119 and 216 developed after irradiation with UV light, were scraped off and added to young «mutilate» cultures in YC medium, and then incubated for 16 hours. The culture was diluted as already described, and assayed for the presence of phage particles. On plating strain 216 in dilution of 10^{-1} against the «mutilate» indicator surrounded by a zone appeared, but no free plaques. In an experiment carried out with strain 119, the same dilution yielded neither zone-surrounded colonies, nor phage plaques. All this appears to indicate that the amount of the antibacterial principle was not increasing in the presence of cells of a sensitive strain.

Conditions of the formation of the antibacterial principle

Our experiments reported in the foregoing show that certain strains of B. megaterium produce, in various degree an antibacterial principle capable of inhibiting the growth of the «mutilate». It is striking that upon the effect of UV light some of the strains not only became incapable of growth but at

the same time inhibit in their proximity the development of indicator bacteria. In order to gain more information about this phenomenon, experiments have been carried out with strains 119 and 216 in liquid media. It needs to be emphasized that the effect of irradiation with UV light was found to depend to a very large extent on the composition of the media. Since so far we have succeeded to a limited extent only in elucidating the effect of the composition of media upon the phenomenon described in this paper, we must confine ourselves to experiments giving unequivocal results.



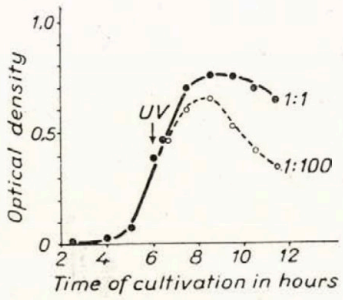
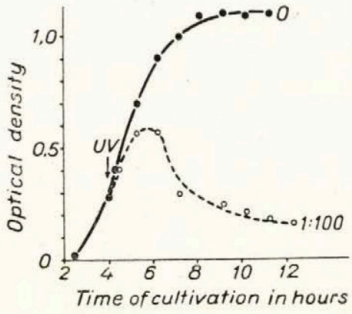


Fig. 8. Experiment in medium 9 (Centrifugate of control culture displayed no antibacterial action)
Fig. 9. Experiment in YP medium. (Numerals next to curves indicate titre of megacine)



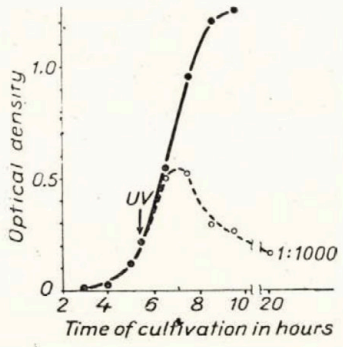


Fig. 10. Experiment in YC medium. (Centrifugate of control contained no megacine)
Fig. 11. Experiment in undiluted «neutral» yeast extract. (Centrifugate of control contained no megacine)

In essence, our procedure was as follows. A 16-hour culture obtained on YP agar was washed with saline and the suspension adjusted to an optical density of 0,400. This served as inoculum. Twenty ml of the medium sterilized in an Erlenmeyer flask with a tube fused onto its side were inoculated with 0,1 ml of suspension and incubated under shaking. On having attained the desired stage, 10 ml of culture were removed, poured into a sterile Petri dish,

and irradiated with UV light from a distance of 25 cm. During irradiation the suspension was constantly stirred. The irradiated suspension was then placed into a sterile flask and reincubated simultaneously with the non-irradiated suspension. From time to time, the degree of optical density was determined.

In determining the antibacterial principle which had formed and which hereafter will be termed megacine, the following procedure was employed. One half ml of young culture of the indicator strain (optical density 0,400) was poured on a YP agar plate dried. Serial dilutions prepared from the lysate, 0,02 ml of each dilution were dripped onto the plate and incubated for 8 to 10 hours. The highest dilution giving a distinct spot of few millimetres in diameter was considered to be the titre.

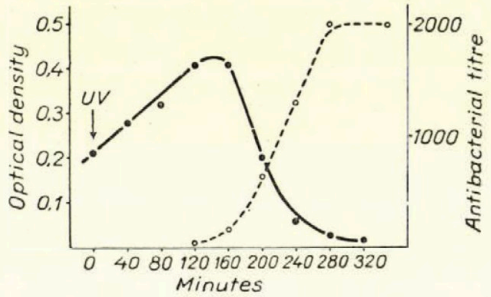


Fig. 12. Behaviour of irradiated culture and release of megacine. (Growing culture of an optical density of 0,200 irradiated with UV light for 35 secs.; after reincubation, titre of megacine determined in supernatant of samples withdrawn from time to time. Indicator strain 213. Unbroken line indicates optical density; broken line, titre of megacine)

The importance attaching to the composition of the media was revealed by the experiments presented in Figs. 8 to 11. In these experiments, young cultures of strain 216, grown in different media of an approximately identical optical density, were exposed to UV light for 30 seconds, and reincubated. At the end of the experiments, the antibacterial titre of the centrifugate of the culture was determined by means of the «mutilate» strain. Depending on the nutrient medium employed, marked differences could be established in the growth of both the control and the irradiated cultures. In addition, substantial differences were noticeable in the amount of the antibacterial principle that had formed. In YP medium, the control culture was observed to stop growing very soon; upon the action of UV light lysis was found to be slow and only partial, and the amount of megacine formed to be very small. Most characteristic of all were the conditions in medium 9. Lysis started as early as in the second hour following irradiation, and in about four hours it was almost complete. The lysate of the same culture was found to be effective up to high titre. In the not irradiated culture not even traces of the antibacterial principle were found. Intermediate results between these extreme types were seen in experiments carried out either in «neutral» yeast extract or in YC medium.

Since the most distinctive features had been observed in medium 9, it was decided to continue studying the mechanism of the phenomenon in this medium exclusively. Fig. 12 demonstrates the lysis and the appearance of megacine as a function of time. With advancing lysis, the amount of megacine gradually increases, reaching its peak when dissolution of the culture is almost complete.

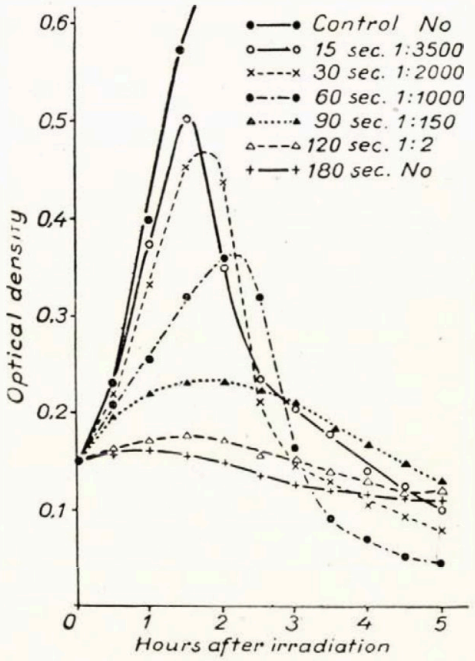


Fig. 13. Growth of cultures irradiated with UV light for different periods of time, and amount of megacine formed. (Antibacterial effect titrated with supernatant of culture centrifuged at end of experiment using indicator strain 213)

In the following experiment, to which Fig. 13 refers, young cultures of strain 216 grown in medium 9 were exposed to UV light for different periods of time, and reincubated individually. It was found that in very young cultures (optical density 0,150) irradiation lasting for 15 seconds sufficed to elicit the characteristic phenomenon, and to induce the production of a great amount of megacine. By raising the UV dose, residual growth became more and more decreased. On application of great UV doses (120 to 180 seconds), there was hardly any growth observable following irradiation, and lysis, too, was noticed to be insignificant. Under these circumstances no production of antibacterial principle was observed. As conclusion of these experiments it may be stated that megacine was found to have formed in the greatest amount when residual growth had come closest to the exponential phase of the control culture, and was followed by sudden lysis.

Apart from the composition of the medium and the dose of UV light, formation of the antibacterial principle was also affected by the age of the culture.Suspensions of strain 216 cultured under identical conditions for different periods of time were diluted with medium 9 to the same optical density (0,180), and irradiated with UV light for 30 seconds. The titre of the lysate obtained after reincubation was determined in strain 213. The titre of the lysate of the youngest ($4^1/_2$-hour) culture, with an original optical density of 0,180, was found to be 1 : 1500. The older, $5^1/_2$-hour culture of an original optical density of 0,480 displayed a behaviour exactly the same as that of the preceding one. Diverging from these results were those of our experiments that had been started with cultures older than 6 hours and of an optical density of 0,770 and 0,950, respectively. Although they hardly differed in residual growth and lysis, yet the amount of megacine formed was considerably less in them than in the previous ones.

Conditions similar to those described above were noted to prevail in the experiments carried out with strain 119. Upon UV irradiation, the young culture prepared in medium 9 became gradually dissolved and the resulting lysate was found to be markedly antibacterial against B. megaterium strains.

It was also attempted to induce the formation of the antibacterial principle with chemical compounds instead of UV irradiation. Our pertaining experiments with strain 216 in medium 9 yielded the following results. On adding to each 1 ml of culture of an optical density of 0,270 1 mg of sodium thioglycolate, lysis started at the end of the second hour and proceeded somewhat slower than usual. The titre of the lysate was 1 : 20 000. The lysate obtained simultaneously with UV irradiation was of the same effect. Induction only set in if the thioglycolate was added to the culture already in the state of growing. If added to the medium before inoculation, the rate of bacterial growth was found to be perfectly normal. Induction has failed with 2,5 mg/ml of Na ascorbate or with trypaflavine diluted to $2{,}10^{-6}$ or $4{,}10^{-6}$, respectively.

The inducibility of strain 216 by UV light to produce the antibacterial principle under optimum physiological conditions seems to be a hereditary quality of the strain. All our attempts at making it to lose this character have failed. The streptomycin resistant variant of the strain tolerating as much as 200 μg/ml of the antibiotic, was also inducible with UV light. We also failed to «cure» the strain by serial passages for long periods of time in a citrate medium. In *Wahl*'s citrate medium [9], by transfers made in 2 to 3 day intervals, the strain was maintained through 58 passages. The culture isolated from the last passage proved to be inducible with UV light, and its lysate was found to contain the antibacterial principle. The 58th subculture of strain 899(1) serially passaged in *Wahl*'s medium gave, on the other hand, no indication of any lysogenic character.

The properties of the antibacterial principle megacine

Depending on the experimental conditions and the indicator strain employed, the antibacterial effect of the lysates differed very considerably. Under optimum conditions titres of 1 : 10 000 to 1 : 20 000 could be established. As a rule, they were, however, lower. To some extent, the effect was also influenced by the composition of the medium used at titration. YP and YC media proved to be the most appropriate ones. The lysates were found to exert an effect on all the B. megaterium strains that had so far been studied. Over and above the 21 B. megaterium strains dealt with in the foregoing, our studies were extended to 20 additional strains, some of them freshly isolated, some others coming from established collections. All 41 strains, without exception, were sensitive, although in this respect very essential individual differences were noticed between them. Table II presents our findings concerning some of these strains.

Table II

Titres against B. megaterium strains of megacine preparations obtained from strains 119 and 216

Indicator strain	Antibacterial titre	
	119	216
«Mutilate»	1 : 2500	1 : 2500
899(1)	1 : 10000	1 : 10000
213.....	1 : 10000	1 : 10000
119.....	1 : 160	1 : 160
216.....	1 : 320	1 : 320

Note : Titration was performed on YP agar.

As seen in Table II, the two megacine preparations obtained from strains 119 and 216 exerted the greatest effect on the lysogenic strain 899(1) and on strain 213. It is very interesting that the productive strains themselves proved also sensitive to the antibacterial principle, although to a considerably lesser extent than the others.

This fact alone would suffice to contradict the phage character of the principle, but apart from the experiments already described the following observations also speak against it.

Two ml of the lysate obtained from strain 216 and active upon the «mutilate» strain up to a dilution of 1 : 3200, were added to 8 ml of a «mutilate» culture, of an optical density of 0,210, prepared in YC medium, and then reincubated. After addition of megacine, the optical density of the young culture ceased to increase, moreover, it began to decrease slowly. Thus, by the end of the third hour, it decreased to 0,140, by the end of the fifth to 0,130 ; and in the 18th hour it was found to be almost completely lysed, yielding a value

of 0,060. With a sample taken at this stage, an attempt was made to demonstrate the presence of phage in the usual way, but with no success. The antibacterial titre of the supernatant, as determined after centrifugation of the culture, was 1 : 256. This value was in fair agreement with that expected on the basis of the dilution (1 : 320). Thus, under the experimental conditions described, the principle did not increase in amount.

Passing through Seitz EK filter did not reduce the antibacterial effect of the lysates. Megacine does not pass parchment and is very slightly diffusible in agar. The principle was precipitated by ammonium sulphate at 75 per cent

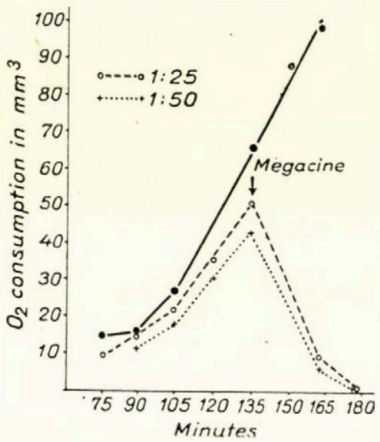


Fig. 14. O_2 consumption of growing strain 213 after addition of megacine. (The individual values are the results of 15-minute determination)

saturation. Commercial trypsin concentrate at pH 8 inactivated it within a short time.

The antibacterial effect of the lysates was decreased only at extreme pH values. To a borate buffer series of different pH values lysate was added at the ratio of 1 : 10, and the mixture kept in a water bath at 30° C for 30 minutes. Under these conditions its effect did not decrease between the pH values 3,34 and 11,01. With growing alkalinity, at pH 12, only 50 per cent of the effect remained, and only 3 per cent in a buffer of pH 12,9. In buffers of 2,61 and 1,42, 25 per cent of the original effect was left untouched.

The antibacterial action of megacine proved to be of bactericidal character. This already indicated by our experiment carried out in the Warburg manometer, the results of which are shown in Fig. 14.

As seen in this diagram, megacine added to a growing bacterial culture immediately reduced its respiration; in 50 minutes the suspension completely ceased consuming O_2.

In order to study its bactericidal effect, various dilutions of the lysate were added to cultures of strain 213 developed in YC medium. Samples were

then withdrawn at different intervals and diluted 1 : 100 with saline containing 20 per cent medium. This stock served for further dilutions to count the viable bacteria by plating 0,1 ml of each of the appropriate dilutions on YC agar surface. Fig. 15 shows the bactericidal effect of the lysate of strain 216.

It can be seen in Fig. 15 that the bactericidal effect manifested itself within a very short time ; however, even at the end of the experiment 0,23 and 0,63 per cent of the bacteria, respectively, were still viable.

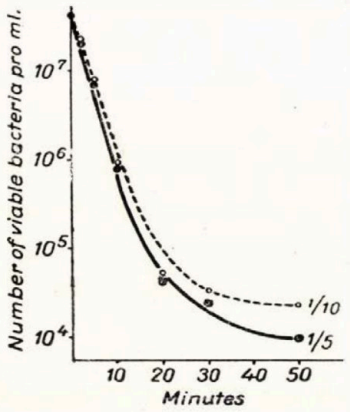


Fig. 15. Bactericidal effect of megacine prepared from strain 216 on suspension of strain 213

The megacine preparation obtained from strain 119 behaved somewhat differently. Here the 1 : 5 and 1 : 10 dilutions were much more active than in the previous experiment. The 1 : 25 and 1 : 50 dilutions, on the other hand, displayed a very limited bactericidal effect (Table III).

Table III

Bactericidal effect of megacine obtained from strain 119 on suspension of strain 213

Dilution of lysate	Viable bacteria after		
	2 minutes	10 minutes	30 minutes
1 : 5	$15 \cdot 10^6$	$40 \cdot 10^3$	$<10^{3}$*
1 : 10	$90 \cdot 10^6$	$21 \cdot 10^5$	$11 \cdot 10^4$
1 : 25	$135 \cdot 10^6$	$90 \cdot 10^6$	$85 \cdot 10^6$
1 : 50	$170 \cdot 10^6$	$130 \cdot 10^6$	$115 \cdot 10^6$
0 (control)	$176 \cdot 10^6$/ml		

* No colonies developed from the 0,1 ml explanted from the lowest (1 : 100) dilution used in determining the bacterium count.

Discussion

In the last few years, our knowledge of lysogeny has been increased rapidly and the phenomenon has been given a general biological interpretation, mainly by workers of the Pasteur Institute, whose theoretical conception and hypothesis have been summarized in *Lwoff*'s recently published excellent review [10].

Lwoff and his associates have based their conception for the most part on their experiments carried out with the B. megaterium strain 899(1) prompted by their studies; which by today can be regarded as classic, we thought it justified to investigate some other strains of this bacillus species; this all the more as knowledge concerning the lysogenic strains of B. megaterium is still deficient in several respects. Thus, for instance, the mechanism of the process is far from clear by which *den Dooren de Jong* obtained the phage-sensitive, so-called «mutilate» strains [11]. Equally little is known about the ecology of the lysogenic B. megaterium strains. This was what has made us to study strains occurring in nature.

Concerning the distribution in nature of lysogenic B. megaterium strains *den Dooren de Jong* wrote [12]: «Ich wage sogar die These auszusprechen, dass die Megaterium-Stämme ohne Ausnahme Bakteriophagen produzieren . . .». Yet, in the course of his experiments only three out of 18 strains proved to be lysogenic. The reason of this was ascribed to the many technical difficulties attaching to the verification of the lysogenic character of a given strain, for, in demonstrating lysogenesis, the sensitiveness of the individual «mutilate» strains as well as the selectivity of the phages produced are to be taken into account, factors which do not always permit the creation of favourable conditions. In support of his above statement, *den Dooren de Jong* aligned his observations made during the appearance of secondary colonies, the «mutilates»; and the morphological changes of a degenerative character he had seen in the cells studied.

According to *Cowles* [13], lysogenic B. megaterium strains rarely occur in nature. Not one did he succeed in isolating.

Of the 16 strains isolated by us from various soil samples, animal excrements, and the air, one only proved to be lysogenic. On the other hand, while studying our strains another, hitherto unknown, type of lethal biosynthesis has been observed. It seems that among B. megaterium strains to be found in nature this phenomenon occurs more frequently than lysogenesis. As its cause we succeeded in pointing out a soluble principle of protein character. Our observations were in many respects similar to the so-called bacteriocinogenesis described in certain strains of E. coli and Ps. pyocyanea. *Gratia* [14, 15] was the first to draw attention to the possibility of an antagonism existing among the individual strains of E. coli. This observation was subsequently carefully studied by *Fredericq* [16], and other investigators [17, 18]. For the antagonism, a material of protein character was held responsible. *Jacob* et al. [19] demon-

strated that there also exists an E. coli strain the culture of which gradually lysed upon irradiation with a small dose of UV light, and that the arising lysate exerted a marked bactericidal effect on certain sensitive strains. Quite recently, *Jacob* [20] observed a similar phenomenon in one of his Ps. pyocyanea strains, and termed this antibacterial agent pyocine.

The results of our studies on B. megaterium resemble the above in many ways. We, too, observed that there exist strains which, although in a slight degree, are antagonistic to the «mutilate» used as an indicator, without any kind of induction.

Particularly those two strains have caught our attention, of which it could be established already from tentative tests that they become dissolved on the effect of UV irradiation and, in addition, inhibit the growth of the «mutilate» cells in their vicinity. Sytematic studies enabled us to observe the effect on induction of physiological conditions, primarily of the composition of the medium. The antibacterial principle in the lysate of bacteria dissolved by the optimum dose of UV light was found to possess a protein character. For this antibacterial principle, which on account of both its mode of formation and its biological properties should be classed as bacteriocine, we venture to suggest the designation, megacine. The antibacterial spectrum of megacine is very narrow. Besides B. megaterium, no other bacterium species had been found sensitive to it in our preliminary investigations [1]. Later, however, when these experiments were extended to include several strains of other Bacillus species, we did come upon a few sensitive ones. Certain coccus strains, rather frequent in the air, were also found to be sensitive to megacine [21].

There is, however, an essential point in which the effect of megacine differs from that of the bacteriocins already known. While only certain strains of the corresponding bacterium species are sensitive to pyocine or the colicines, megacine was found to exert an effect on all the 41 B. megaterium strains studied. Most striking was the finding that megacine also acts on the homologous strain, i. e., on the one that produces it. Yet it is certain that the megacine-producing strains are considerably less sensitive to it than are others.

Megacine formation is not correlated with secretion, but with lethal biosynthesis. Only in inducible strains is this markedly perceptible. Following optimum UV irradiation, the optical density of the cultures increases substantially, and it is only at the end of the second hour that lysis of the bacteria suddenly sets in. By virtue of an increase in the so-called «growth units», computed by utilizing the values of optical density, megacine formation and, therewith, disruption of the bacteria may be preceded by two divisions. This induction was successful with thioglycolate, but failed with sodium ascorbate. Our experiments with chemical inducing agents cannot yet be regarded as completed.

Megacine synthesis recalls in several of its bearings the knowledge we possess of the lysogenesis of B. megaterium. In both cases strains inducible

and non-inducible with UV light have to be taken into account. The experimental data at our disposal do not as yet furnish us with sufficient information as to whether or not the two phenomena are correlated genetically.

On the basis of the mode of action displayed by colicine and pyocine, respectively, studies undertaken by *Jacob et al.* [19, 20] revealed that one particle of these materials was sufficient to destroy a sensitive cell. In their view, the bacteriocins mentioned above are adsorbed irreversibly onto the receptors of the sensitive cells, reminding one of the mode of action displayed by phages. We do not consider the results of our experiments with megacine suitable for similar computations. In this connection, the greatest difficulty is caused by the fact that B. megaterium is not an unicellular organism, cell wall formation being an earlier process than division. The foregoing would make it appear that the bactericidal behaviour of the individual megacine preparations is not quite identical either. Thus, when megacine obtained from strain 216 had been added to dense bacterial suspension, there arose a state of equilibrium, which was conspicuously reminiscent of the experiments made by the cited authors with colicine and pyocine, respectively. On the other hand, in adequate concentrations, the preparation derived from strain 119 exerted its bactericidal influence as long as the experimental conditions permitted the demonstration of live germs in the mixture. Whether the cause of the differences in affinity is or is not correlated with the antigenic structure of the megacine-producing and the indicator strains, represents a question which cannot be answered before more will be known of the antigenic structure of B. megaterium.

Summary

1. Out of 16 B. megaterium strains isolated by us from soil samples, animal excrements, and the air, one only proved to be lysogenic.

2. On the other hand, a great number of the strains displayed an antagonistic effect of a non-phage character on the «mutilate» employed as indicator. This phenomenon is in no connection with the strain being lysogenic or non-lysogenic.

3. In three strains the antagonistic action was found substantially to increase on irradiation with a small dose of UV light. The cells of two strains (119 and 216) dissolved completely, with simultaneous enhanced production of the antibacterial substance.

4. The same effect of UV light was exerted also on cultures prepared in liquid media. However, success in this respect greatly depended on the composition of the medium and the age of the culture. Formation of the antibacterial substance was most intensive when an adequately small dose of UV light had been used for induction. The phenomenon could be elicited also by the addition of sodium-thioglycolate.

5. Under optimum conditions, lysis of the UV irradiated culture began in the second hour. It is estimated that in the period of residual growth the cells pass through two divisions, when the antibacterial principle, which is designated as megacine, is being formed. Megacine formation is thus the effect of lethal biosynthesis and its release coincides with cellular dissolution.

6. Megacine possesses properties indicative of protein character.

7. Megacine proved to be bactericidal against all the 41 B. megaterium strains studied. The strains producing the antibacterial substance are also sensitive to it. In this respect megacine substantially differs from the so-called bacteriocins already known, viz. the colicines and pyocine, which act on certain sensitive strains only.

LITERATURE

1. *Ivánovics, G.* and *Alföldi, L.:* Nature, 1954, 465
2. *Smith, N. R., Gordon, E. R.* and *Clark, F. E.:* U. S. Dept. Agric., Misc. Publ. No. 599 (194.).
3. *Ivánovics, G.:* Zbl. f. Bakt. Orig. I, **159,** 178 (1953).
4. *Ivánovics, G.:* *ibid.* **138,** 211 (1937).
5. *Ivánovics, G.* and *Horváth, S.:* Acta Physiol. Hung. **4,** 175 (1953).
6. *Ivánovics, G.* and *Bruckner, V.:* Ztschr. f. Immunitätsf. **90,** 304 (1937).
7. *Welshimer, H. J.:* J. Bact. **61,** 153 (1951).
8. *Lwoff, A.* and *Gutman, A.:* Ann. Inst. Pasteur **79,** 815 (1950).
9. *Wahl, R.:* Ann. Inst. Pasteur **72,** 473 (1946).
10. *Lwoff, A.:* Bact. Reviews **17,** 269 (1953).
11. *den Dooren de Jong, L. E.:* Zbl. f. Bakt. Orig. I. **120,** 15 (1931).
12. *den Dooren de Jong, L. E.:* *ibid.* **120,** 15 (1931).
13. *Cowles, P. B.:* Yale J. Biol. Med. **25,** 313 (1953).
14. *Gratia, A.:* Ann. Inst. Pasteur **48,** 413 (1932).
15. *Frédericq, P.* and *Gratia, A.:* C. R. Soc. Biol. **143,** 560 (1949).
16. *Frédericq, P.:* Ann. Inst. Pasteur **84,** 294 (1953).
17. *Halbert, S. P.* and *Magnuson, H.:* J. Immun. **58,** 397 (1948).
18. *Halbert, S. P.* and *Gravatt, M.:* *ibid.* **61,** 271 (1949).
19. *Jacob, F., Siminovitch, L.* and *Wollmann, E. L.:* Ann. Inst. Pasteur **83,** 295 (1952).
20. *Jacob, F.:* *ibid.* **86,** 1 (1954).
21. *Ivánovics, G., Alföldi, L.* and *Ábrahám, E.:* (To be published).

О ЛИЗОГЕНЕЗЕ ШТАММОВ B. MEGATERIUM И О МЕГАЦИНЕ — АНТИБАКТЕРИАЛЬНОМ НАЧАЛЕ ЭТОГО ВИДА БАЦИЛЛ

Г. Иванович и *Л. Альфёльди*

Резюме

1. Из 16 штаммов B. megaterium, выделенных из проб земли и испражнений животных, а также из воздуха, лизогенным оказался только один.

2. В противоположность этому, большинство штаммов оказывало антагонистическое действие не фагового характера на «мутилат», используемый в качестве индикаторного штамма. Это явление не связано с лизогенностью или нелизогенностью штаммов.

3. У трех штаммов значительно повысилось антагонистическое действие при облучении ультрафиолетовыми лучами в малой дозе. Клетки двух штаммов (№№ 119 и 216) совершенно растворились и вместе с тем значительно повышалось производство антибактериального вещества.

4. Ультрафиолетовые лучи действовали также и на культуры, полученные в жидких средах. Успешность этого, однако, в большой степени зависит от состава среды и от возраста культуры. Наибольшее количество антибактериального вещества образовывалось в случае ультрафиолетового облучения в надлежаще малой дозе. Впрочем это явление вызывалось также и путем добавления тиогликолата натрия.

5. В оптимальных условиях под ультрафиолетовым облучением культуры начинают растворяться во втором часу. В фазе резидуального прироста происходит еще, приблизительно, двухкратное деление клеток, в процессе чего образуется антибактериальное вещество, названное нами мегацином. Итак, образование мегацина является следствием летального биосинтеза и освобождение мегацина совпадает со временем растворения клеток.

6. Мегацин обладает свойствами протеиноподобных веществ.

7. Мегацин оказался бактерицидным в отношении исследованного до сих пор 41 различного штамма B. megaterium. Штаммы, производящие антибактериальные вещества, являются также чувствительными к мегацину. С этой точки зрения мегацин значительно отличается от известных до сих пор, так называемых бактериоцинов, колицинов и пиоцинов, которые оказывают действие только на некоторые чувствительные штаммы.

EXPERIMENTAL SHIGELLA KERATOCONJUNCTIVITIS

A PRELIMINARY REPORT

By
B. SERÉNY

State Institute for Public Health

(Received August 3, 1954)

Ever since the discovery of the causative agents of dysentery, there have been many attempts to elicit in animals a disease inducing the symptoms and pathomorphological lesions of human dysentery, well reproducible under experimental conditions. These efforts were not quite without success. By oral administration of Shigella strains it was possible to bring about lesions similar to those of human dysentery in animals more easily adaptable to laboratory conditions than apes, which are difficult to procure and to keep under our climate. *Rutschko* could successfully infect both hens and cats with Shigella by mouth, while *Sergueyevitch* infected cats. *Zoeller* and *Manoussakis* have tried a new procedure, conjunctival infection with dysentery cultures, after sensibilization with bile. Subsequent to the infection keratoconjunctivitis developed in 50 per cent of the guinea pigs ; the other half of the animals, however, remained healthy. In rabbits inflammation occurred only if the eyes had been covered with a protective bandage. Presumably for want of the regular reproducibility of reactions, the authors themselves did not employ the procedure in their later studies. *Bingel* introduced Shigella through a catheter into the bladder of female guinea pigs and could induce cystitis in this way with freshly isolated strains. This vesical technique did not come into general use because bladder dysentery is poor in symptoms and for diagnosing it serial sections are needed and the use of a great number of animals. In spite of the results obtained, for inducing experimental dysentery parenteral (subcutaneous, intravenous or intraabdominal) infection has remained the method of choice, giving rise in the experimental animals to a septic-toxaemic syndrome differing from human dysentery. The lack of an adequate experimental model test has greatly delayed the successful study of the theoretical and practical problems of dysentery.

In the course of our investigations into the natural immunity of laboratory animals has the idea of conjunctival infection been raised, unawares of the unsuccessful experiments by *Zoeller* and *Manoussakis*. In contrast with these authors, we have found that under specific conditions the method provides

a good experimental model test. The results of our experiments may be summarized as follows.

For conjunctival instillation one-day old broth agar, blood-agar, or DC cultures were used. Typical keratoconjunctivitis developed in every single case, provided the inoculation was carried out by administering under the upper and lower eyelids directly from the culture medium, without any preliminary treatment, half a normal wire loop of one day incubated Shigella. (The animals had not been prepared for the inoculations consequently they were not given bile either.) The infective dose is relatively high, as confirmed by the fact that from certain Shigella strains a considerably smaller number of bacteria suffice to bring about the characteristic lesion. Another condition required for effective infection is the use of subcultures of freshly isolated strains. Infections carried out with subcultures of strains kept in the laboratory for longer than half a year remained ineffective.

Conjunctival infection is followed by an incubation period of 1 to 3 days after which time severe, progressive inflammatory symptoms appear in the eye membranes. At first, conjunctival oedema, and then conjunctivitis develops, with a copious mucopurulent, whitish-grey exudate which, under the microscope, is seen to contain polymorphonuclear leucocytes in fibrous masses. During the following days the inflammation spreads onto the cornea. Between the swollen eyelids only the mucopurulent exudate is visible, or the whitish, opaque cornea which later on becomes completely covered by a dirty whitish fur. The process reaches its climax within a few days, then recovery sets in without any treatment. Simultaneously with the regression of the inflammatory symptoms and the decrease of the exudate, the marginal parts become clear and the periphery of the blood-red cornea appears in an annular form. The width of the red ring is constantly increasing, until it has extended to the whole cornea. Thereupon pigment appears in the cornea which recovers its brightness, but its surface remains uneven for a longer period. At the end of the 3rd week the disease — at least in albino guinea pigs — ends with the full reparation of the cornea. In dark-haired animals the cornea remains opaque for a longer time.

In the first week of the disease the Shigella strain used for the infection can be cultured in large quantities from the eye exudate. With the subsiding of the inflammatory symptoms the number of colonies grown on the culture medium decreases, the bacteriological findings, however, remain consistently positive until the end of the illness. The first negative finding was generally obtained at the end of the second week.

Conjunctival infection of guinea pigs has been carried out in 220 case, partly with freshly isolated or laboratory Shigella strains and partly with other freshly isolated cultures of Enterobacteria. One normal loop-ful of the one-day old culture of 76 freshly isolated Shigella strains was used for 134 conjunctival infections. Among the 76 strains there were 52 strains of Sh. flexneri, belonging

to different (1., 2a., 3., 6., *x* var. or *y* var.) types, 23 of Sh. sonnei and 1 of Sh. ambigua. The typical keratoconjunctivitis described above appeared after all the 134 conjunctival infections. 21 conjunctival infections were carried out with one-day old subcultures of laboratory Shigella strains. The eye remained intact in all cases. In addition to the Shigella strains, 65 conjunctival infections were carried out also with one loopful each of one-day old blood agar cultures of freshly isolated different Enterobacteria (10 S. typhi, 2 S. typhimurium, 1 each of S. paratyphi A, B, anatum, and meleagridis, 7 E. coli, 6 E. coli dyspepsiae, 5 Proteus and 6 Ps. aeruginosa). A lesion similar to, or easily confounded with, that due to Shigella strains was never observed, at most mild conjunctivitis of short duration appeared. Should further investigations confirm our experience, the procedure might be employed for identifying Shigella strains.

The dysenterial nature of the keratoconjunctivitis occurring after conjunctival Shigella infection is borne out by the following.

1. After instillation of other kinds of bacteria no keratoconjunctivitis manifested itself.

2. All along the process Shigella can be isolated from the exudate of the eyes.

3. Simultaneously with the disease, homologous agglutinins appear in the blood serum of the infected animals. Before the infection the agglutinin titre of the guinea pigs tested was below 1 : 10, gradually to rise after the infection and to reach its peak value of 1 : 320 by the third week. Thereafter it slowly levelled off.

4. After the conjunctival infection carried out in the discussed manner, typical keratoconjunctivitis occurred in every single case.

On the strength of our experiments and at variance with the results of *Zoeller* and *Manoussakis* the following statements can be made.

Subsequent to conjunctival infection carried out with large quantities of freshly isolated Shigella strains, an easily reproducible, well definable disease develops in the eyes of the guinea pig. The disease is well observable by simple means and is suitable for studying localized dysentery lesions. The keratoconjunctivitis caused by Shigella might be used as a model test in the research of the theoretical and practical problems of dysentery. The ineffectiveness of laboratory strains suggests that, apart from their antigenic structure and endotoxin content, other factors may also be concerned.

LITERATURE

Rutschko, I.: Arch. f. Hyg. **109,** 231 (1933).
Сергеевич, Е. А.: жмзи. 4 (1954).
Zoeller, Chr. and *Manoussakis : C. R.* Soc. Biol. **91,** 257 (1924).
Bingel, K. F.: Ztschr. f. Hyg., **125,** 110, 574, 610 (1944).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ КЕРАТОКОНЪЮНКТИВИТ, ВЫЗЫВАЕМЫЙ ДИЗЕНТЕРИЙНЫМИ ПАЛОЧКАМИ

Б. Шерень

Р е з ю м е

Автор знакомит с новой дизентерийной моделью в опыте на животных. Введением морским свинкам под веко (в количестве одной петли) посеянной на кровяной агар однодневной культуры дизентерийного штамма,—выделенного не ранее полугода тому назад, — можно вызвать типичный острый кератоконъюнктивит, дающий возможность изучения локализованных дизентерийных поражений. Автор в 134 случаях производил заражение конъюнктивы различными дизентерийными палочками, а именно 52 штаммами дизентерии Флекснера различного типа, 23 штаммами дизентерии Зонне и 1 штаммом дизентерии Шмиц—Штуцера. В каждом случае развивался типичный кератоконъюнктивит с симптомами острого воспаления, повышением титра гомологичных агглютининов и последовательными положительными результатами бактериологических испытаний. В результате 34 заражений конъюнктивы другими бактериями (typhus, paratyphus, coli, coli dyspepsiae, proteus, pyocyaneus) ни в одном случае не развивался кератоконъюнктивит, а лишь только (при заражении паратифозной палочкой) легкий, коротковременный катарральный конъюнктивит. Упомянутая модель может легко наблюдаться, последовательно воспроизводиться и хорошо определяться, ввиду чего является подходящей для использования в процессе изучения связанных с дизентерией теоретических и практических проблем.

THE NATURE OF SPECIFIC POLYSACCHARIDES OF TUBERCLE BACILLI

By

J. FÖLDES

Institute of Microbiology, Medical University, Szeged

(Received August 10, 1954)

A few years ago *Middlebrook* and *Dubos* [1] evolved a new method for the serological diagnosis of tuberculous disease, on the basis of *Landsteiner*'s finding [2] that certain bacterial polysaccharides are capable of adsorbing onto erythrocytes or the surface of particles of other suspensions, thereby rendering them specific and agglutinable by the homologous immune serum. Agglutination of erythrocytes is an indicator of precipitation occurring on the surface.

Applying this method, the serum and cerebrospinal fluid of a great number of tuberculous patients have been tested in our Institute [3]. These studies induced us to investigate the new method closely, to concentrate upon the nature of the adsorbing materials, to dwell upon the quantitative aspects in adsorption, and finally led us to the conclusion that in old tuberculin (Phylaxia, Budapest) there were two specific components differentiable by this method: the one, which by adsorbing onto erythrocytes rendered them specific and, thus, agglutinable by the serum of tuberculous subjects; the other, which was incapable of adsorbing onto the red blood corpuscles but neutralized the antibody, which was demonstrable by the inhibition of the agglutinating serum. On controlling this observation carefully and studying the quantitative conditions of adsorption and inhibition, it was found necessary to isolate the two specific components of different activity and to subject them to detailed chemical and serological analysis. The present paper will present our results and elucidate some details concerning the nature of the haemagglutination test.

Material and methods

Extraction with phenol; washing with aceton. 50 g of tubercle bacilli cultured on Sauton's medium then killed by heat and dried were suspended in 500 ml of 88 per cent phenol and extracted at room temperature with constant stirring for 12 hours. The centrifuged sediment was resuspended in 500 ml of fresh phenol, allowed to stand overnight whereafter, it was again extracted for 12 hours. The operation of extracting the centrifuged sediment was repeated a third time. The phenol-treated bacillary mass was then washed three times with acetone and dried.

Extraction with methanol buffer solution. The phenol-treated and acetone-washed dried mass of tubercle bacilli was, in the first step, extracted at room temperature, under constant

stirring for 12 hours, with 500 ml of a methanol buffer solution containing 0,55% NaCl, 0,50% NaH_2PO_4, and 20% methanol as described by *Dubos* [1]. The centrifuged sediment was then extracted twice again, each time for 5 hours with 250 ml of buffer solution. Subsequently 2 per cent of sodium acetate and 1 per cent of acetic acid were added to the pooled and slightly viscous supernatants, and the specific materials precipitated from the solution by adding 5 volumes of ethyl alcohol. The precipitate was allowed to stand overnight at +4° C, then it was centrifuged and the sediment dissolved in the above described acetate buffer. Following the removal by centrifugation of the undissolved part, the specific materials of the solution were precipitated in the manner expounded above. This was repeated 6 to 7 times, until the material precipitated by alcohol was completely dissolved in the acetate buffer. The solution was then dialyzed against running tap water for 24 hours, whereupon the material precipitated by alcohol was washed in absolute alcohol and dried in vacuum over $CaCl_2$. The dry substance was a yellowish-white amorphous powder. Its symbol is P_1.

Extraction after treatment with NaOH. 50 g of phenol-treated, acetone-washed, and dried tubercle bacilli were separated by hydrolysis in one case with 0,5 N, in the other with N NaOH (500 ml). Following hydrolyzation under a reflux for two hours, the undissolved part was centrifuged and the sediment hydrolyzed in another 500 ml of NaOH in the same manner for the duration of one hour. Subsequent centrifugation yielded hardly any sediment, but a white saponaceous crust formed on the surfaces of the russet-coloured liquid. On saturating the pooled solutions with ammonium sulphate a brown precipitate appeared, which was removed. After concentration in vacuum the lemon-coloured solution was dialyzed against running tap water for 24 hours. Two per cent sodium acetate and one per cent acetic acid were then added to it, after the dissolution of which the specific materials were precipitated from the solution with ethyl alcohol. Precipitation may be elicited in one step by the addition of 5 volumes of alcohol, or by adding 1 to 6 volumes in fractions. The precipitate was left standing over night, then it was centrifuged and the sediment dissolved in the above buffer solution. After removal by centrifugation of the undissolved part, the solution was repeatedly shaken with a mixture of chloroform and butyl alcohol. To the thus deproteinized solution barium acetate was dripped until precipitation ceased completely. Barium was precipitated from the solution with an adequate amount of H_2SO_4. This precipitate was removed by centrifugation and the solution dialyzed against running tap water. Thereafter, the specific materials were precipitated by alcohol, the precipitate washed with absolute alcohol, and dried. (Cf. the previous extraction.) The dry extract was a slightly yellowish amorphous powder. The material extracted after separation by 0,5 N NaOH is denoted P_2. The denotations of materials precipitated with alcohol by fractions are $P_{2/a}$—$P_{2/f}$. The symbol P_3 is used for material extracted after treatment with N NaOH.

Fractionation of the specific materials by lanthanum-nitrate precipitation. Precipitation of the desoxyribonucleic-acid (DNA) content of extract P_1 was achieved with lanthanum nitrate in the following manner [4]. To each 10 ml of a solution containing 100 mg of tubercle-bacillus extract per 100 ml, 0,4 ml of 2,5 per cent lanthanum nitrate were added and the precipitate centrifuged after the lapse of an hour. Then the supernatant was decanted from the sediment. Both were utilized in the further experiments by removing the excess lanthanum from the solution and setting free the DNA by decomposition of the sediment. The excess lanthanum was precipitated by adding 0,1 N Na_2CO_3 drop by drop until no more precipitate was formed. Before decomposing it, the previous La-DNA complex was washed three times with 0,1 per cent lanthanum nitrate. The washed sediment was decomposed with 2 ml of 0,1 N Na_2CO_3, and the resulting lanthanum carbonate removed from the DNA solution by centrifugation. The centrifuged precipitate was washed twice, each time with 1 ml of Na_2CO_3. The washing fluid and the DNA solution were pooled. For the serological experiments the solutions were made physiologic by the addition of an appropriately concentrated NaCl solution, and made up to 20 ml.

In sensitizing erythrocytes, old tuberculin (Phylaxia, Budapest) in a dilution of 1 : 125, or an adequate concentration of extract P_1, was used. Sheep erythrocytes were stored in a modified Alsever's solution [5]. Of the washed red corpuscles an amount of 1 per cent was added to the sensitizing solution, and the suspension incubated in a water bath at 37° C for two hours. The erythrocytes treated in this manner were washed three times before preparing an 0,5-per cent solution of them.

The agglutinating serum was a mixture of high-titre sera collected on the occasion of blood tests from tuberculous subjects. Until utilized, it was stored at —20° C.

The agglutination test was carried out according to *Dubos'* original description [1], applying the following modification in the technique. The inactivated serum adsorbed with untreated erythrocytes was diluted in geometric progression, in volumes of 0,1 ml, by means of *Takátsy's* spiral loop, on a plexiglass plate [3]. The method was found simple to carry out and its accuracy exceeded that of parallel experiments made in agglutination tubes. To each 0,1 ml of the serum

dilution so prepared, 0,1 ml of an 0,5 per cent suspension of the sensitized sheep erythrocytes was added drop by drop. After slight shaking the mixture was incubated at 37° C and the resulting agglutination read 2 hours later.

Specific inhibition of the agglutinating serum was performed by the same method in the following manner. To each 0,1 ml of the dilutions of tubercle-bacillus extract, 0,1 ml was generally added of the serum dilution four times the concentration of the titre. The mixture was incubated at 37° C for one hour, whereafter 0,05 ml of a 1 per cent suspension of sensitized erythrocytes were added to it drop by drop, so that the total volume amounted to 0,25 ml. Mixing by slight shaking was followed by incubation at 37° C for two hours, when the degree of agglutination inhibition was read.

Chemical analysis of the extract. Qualitative tests : — *Molisch*'s alphanaphthol test and *anthrone* test with *Dreywood*'s reagent [6], using a 10 mg per 100 ml solution of the material to be analysed. *Biuret* test, with 2 per cent solution of the extracts. Quantitative tests : — Determination of the *rotating capacity* at room temperature (18° C), with a 1 per cent aqueous solution of the materials. Determination of the *neutral equivalent*, with 10 ml of a 1 per cent aqueous solution of the extracts. Determination of *nitrogen*, with the micro-Kjeldahl method according to *Pregl* [8]. Determination of the *reducing materials* before and after hydrolysis, using *Hagedorn and Jensen*'s method. *Meybaum*'s [9] *orcinol* test for determining pentoses. *Dische*'s [10] *diphenylamine* test, for detection of desoxyriboses. Determination of *phosphorus*, with *Fiske* and *Subbarow*'s and *Harwey*'s methods [11]. *Hydrolysis of the extracts* for purposes of paper chromatography and electrophoresis was made with 2 N sulphuric acid for two hours, neutralisation with $BaCO_3$. *Paper chromatography* was performed on Whatman's No. 1 paper for 24 hours at room temperature. Solvent : butanol, pyridin, and water in a proportion of 3 : 2 : 1,5 [12] ; for developing aniline hydrogen phthalate was used [13]. *Paper electrophoresis* was made according to *R. Consden* [14], in 0,2 M borate buffer, at a pH of 9,2 ; with 320 V, on Whatman's No. 1 paper measuring 46 cm by 4 cm. For developing aniline hydrogen phthalate was used.

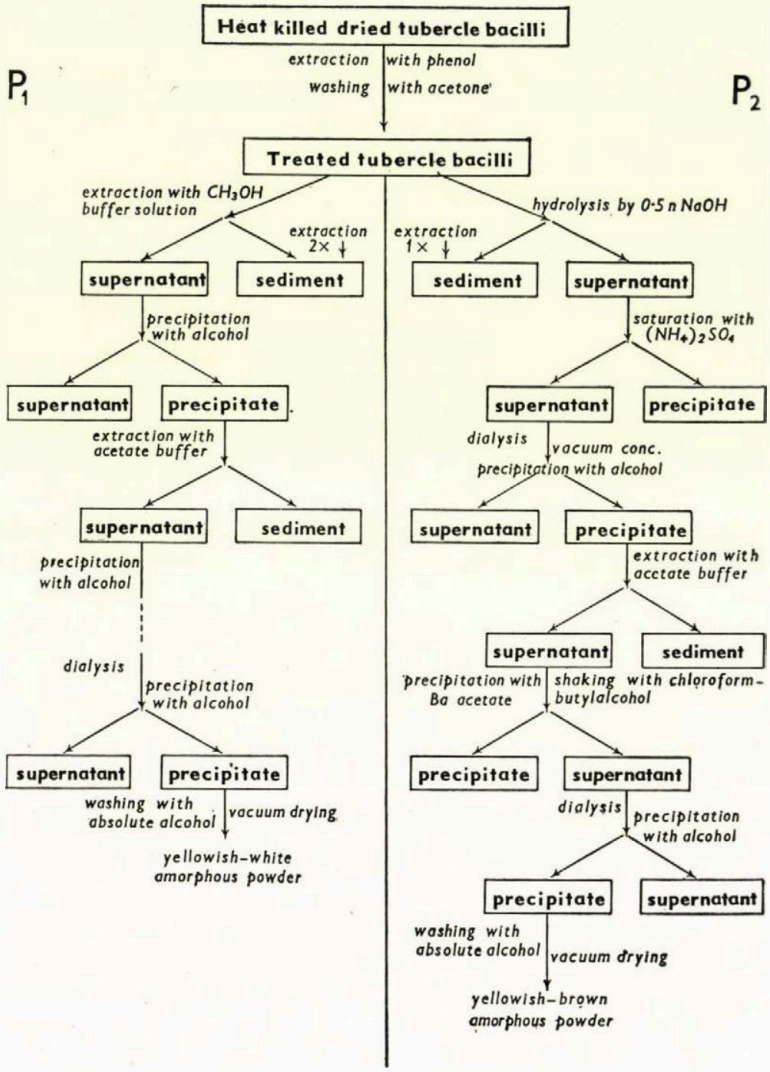
Experiments and results

We possess but imperfect knowledge of the nature of the adsorbing component. In characterizing the material, *Middlebrook* and *Dubos* [1] mention only its polysaccharide nature. According to the findings of *Keogh* [15], it loses its adsorbing capacity upon the effect of alkali and acid. *Schaeffer* [16], in the course of experiments with a different aim, isolated a protein-containing «complex» and a protein-free «simple» polysaccharide from tubercle bacilli, by applying various methods. On the basis of complement fixation and precipitation experiment, *Schaeffer* states that by boiling in diluted alkali, the complex polysaccharide can be transformed into a simple one. These data seem to permit the conclusion that a serologically more active polysaccharide will change upon a slightly powerful interference, and that this change will manifest itself in the loss of certain qualities. On the possession of these data, it appeared expedient to use two essentially different methods for the isolation of the two specific materials of different activity described in the introductory part of this paper. One was extraction of the specific materials *by slight interference*, the other *by rougher separation*. The course taken by each is presented schematically in Table I.

The purpose of the subsequent experiments was to check the results yielded by the preparative method. In assaying the tubercle-bacillus extracts, the extent served as a basis to which the erythrocytes treated with the different dilutions had become specific. The results are summarized in Table II.

Table I

Isolation of the specific polysaccharides of tubercle bacilli. Schematic representation



From Table II it can be seen that erythrocytes in the amount of 1 per cent were rendered completely specific even by 50 mg of extract P_1, per 100 ml and that the 1 mg per 100 ml was still capable of exerting a slight sensitizing effect. Extracts P_2 and P_3 were unable to achieve this even in a concentration of 100 mg per 100 ml.

The former method allows, however, only to assay the adsorbing materials, and no information is obtainable regarding the quantitative conditions of the

polysaccharide which is non-adsorbing but fixes the antibody. This deficiency can be eliminated by the indirect application of the method based on inhibition of the serum agglutinating specific erythrocytes.

Table II

Assay of extracts P_1 and P_2 of tubercle bacilli, based on specificity of erythrocytes treated with different dilutions of extract

1% erythr. treated with mg% sol.		Serum dilutions							
		1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 128	1 : 256
P_1	100	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	—
	50	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	—
	25	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+	—
	10	++++	++++	++++	++++	+++	+	—	—
	5	++++	++++	++++	++++	+++	—	—	—
	1	++++	++++	+	—	—	—	—	—
P_2	100	—	—	—	—	—	—	—	—

Table III

*Assay of extracts P_1 and P_2 of tubercle bacilli, based on inhibition of serum agglutinating erythrocytes rendered specific**

Extract	Dilution of its solution containing 100 mg per 100 ml							
	1 : 32	1 : 64	1 : 125	1 : 256	1 : 512	1 : 1024	1 : 2048	1 : 4096
P_1	—	—	—	—	++	++++	++++	++++
P_2/a	—	—	+	+++	++++	++++	++++	++++
P_2/b	—	—	—	—	+	+++	++++	++++
P_2/c	—	—	—	—	—	++	++++	++++
P_2/d	—	—	—	+	+++	++++	++++	++++
P_2/e	—	—	++	++++	++++	++++	++++	++++
P_2/f	—	++	++++	++++	++++	++++	++++	++++

* When using serum four times the concentration of the titre dilution.

Table III shows in what dilutions of the 100 mg per 100 ml solution of material P_1 and fractions of the extract P_2, derived by alcohol precipitation of varying volumetric proportions, inhibits the agglutination of specific red blood corpuscles, brought forth by a serum four times the concentration of the titre.

Table III reveals that it is the 256 fold and 512 fold dilution, respectively, of the 100 mg per 100 ml solution of the extract P_1 (corresponding to the dilution

of 1 : 512 000), which inhibits the agglutinating serum completely, respectively partially. The various fractions of the extract P_2 inhibit in almost the same order of magnitude : to the greatest extent, the fraction precipitated with 75 vol. per cent alcohol ; the subsequent fractions, to a gradually decreasing extent. On comparing Table III with the preceding one, it will be seen that there are essential qualitative differences in erythrocyte adsorption between the extracts P_1 and P_2, while on the basis of antibody neutralisation only slight quantitative differences can be established.

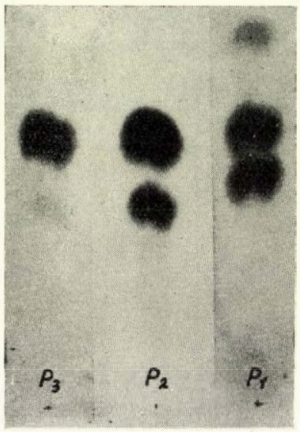


Fig. 1. Paper chromatograms of P_1 P_2 and P_3 after hydrolysis

The results yielded by these experiments necessitated investigations into the correlations between function and structure, of which latter information is best supplied by the characteristic chemical data. These are presented in Table IV which shows the qualitative and quantitative analysis of the fractions precipitated with differing volumes of alcohol from extracts P_1 and P_2, and also gives the titres at which agglutination is inhibited.

The data in Table IV evidence that all the extracts give a markedly positive result, with both carbohydrate reagents and a negative biuret test ; and that the neutral equivalent shows them to be of a slightly acid character. The reducing-material contents vary between 0,71 and 1,42 per cent before, and from 40,6 to 65 per cent, after hydrolysis. The latter parallel to some extent the variations in the agglutination-inhibiting titre. Corresponding to the individual fractions, the rotating capacity ranges from $+71{,}5°$ to $+111°$. In P_2 extracts, the total nitrogen is generally around 1 per cent. Apart from their giving a negative biuret reaction, P_1 extracts are markedly Dische positive, and contain phosphorus. All this seems to point to the presence of nucleic acids, to which further support is lent by chromatography after hydrolysis of P_1, P_2 and P_3 (Fig. 1).

Table IV

Chemical analysis of extracts P_1 and P_2 of tubercle bacilli

Extract	Alcohol conc. %	Qualitative analysis					Quantitative analysis					Titre inhibiting agglutination
		Molisch	Anthrone	Dische	Fiske-Subbarow	Biuret	N %	neutral. equival.	$[\alpha]_D^{18}$ in grades	Reducing materials before hydrolysis	Reducing materials after hydrolysis	
P_1	83	++++	++++	++++	++++	—	4,53	8300	+ 97,5	1,42	51,6	1 : 1024000
P_2/a	50	++++	++++	—	—	—	1,00	9100	+ 71,5	0,58	49,9	1 : 512000
P_2/b	66	++++	++++	—	—	—	1,86	6000	+ 74,0	0,71	53,2	1 : 1024000
P_2/c	75	++++	++++	—	—	—	1,26	5800	+ 85,5	0,80	65,00	1 : 2048000
P_2/d	80	++++	++++	—	—	—	1,28	6600	+ 110,0	0,75	59,7	1 : 1024000
P_2/e	83	++++	++++	—	—	—	1,18	10400	+ 72,7	0,87	52,4	1 : 256000
P_2/f	86	++++	++++	—	—	—	1,08	10100	+ 111,0	0,89	40,6	1 : 128000

+ = When using serum thrice the concentration of the titre dilution.

On the basis of the method applied it may be stated that the P_1 polysaccharide extracted by slight interference is composed of three carbohydrates, while extracts P_2 and P_3 consist of two or one reducing sugars, respectively.

Identification of the individual carbohydrates is possible on the basis of the Rf values. Simultaneously with their determination it is, however, expedient to perform chromatography of other known sugars as well. Fig. 2 shows the chromatograms of a few known sugars along with fraction P_2.

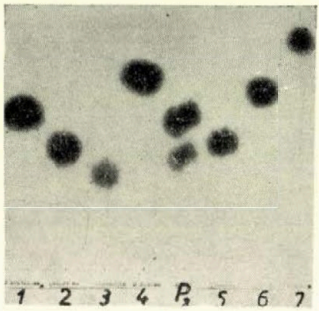


Fig. 2. Chromatograms of a few sugars along with fraction P_2

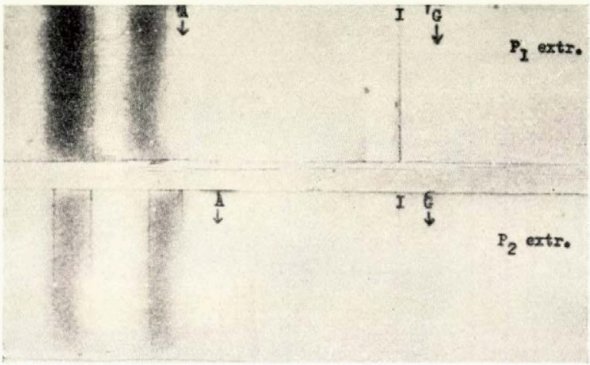


Fig. 3. Electrophoretic pattern of the hydrolysates of extracts P_1 and P_2

Paper electrophoresis also promised to be of assistance in the study of hydrolysis products. In Fig. 3 the electrophoretic pattern of the hydrolysates of extracts P_1 and P_2 is shown, in which two materials of differing of migration speed are demonstrable.

The results of the chromatographic and electrophoretic studies are summarized in Table V. The Rf values shown in it have been compared to simultaneously obtained chromatographic values of known sugars, while electrophoretic mobility is given in relation to the migratory speed of serum albumin.

Table V

Paper-chromatographic and electrophoretic study of the hydrolyzate of extracts P_1, P_2 and P_3

	P_1	P_2	P_3	Product of hydrolysis
Chromatography R_f	0,3 0,39 0,5	0,3 0,39 —	0,3 0,39	Galactose Arabinose D-ribose
Electrophoretic mobility 10^{-5} cm²/V sec.	10,25 12,87	10,25 12,87		

The data in the Figures and the Tables permit of concluding that the three sugar components of extract P_1 correspond to galactose, arabinose, and D-ribose. Fraction P_2 extracted by the rougher method is composed of galactose and arabinose, while in extract P_3 only traces of galactose are present, along with arabinose. Electrophoresis reveals in both materials only two components of different migratory speed at the given pH and ionic strength. Their mobility is 10,25 or 12,87 · 10^{-5} cm²/V. sec., respectively.

Reverting to Table IV, the characteristic data contained in it are supplemented as follows by the results of the chromatographic studies. Extract P_1, of a high nitrogen and phosphorus content, is markedly Dische-positive, and D-ribose is demonstrable in its hydrolyzate. All this allows of the assumption that extract P_1 is more complex, containing, in addition, both desoxyribonucleic acid (DNA) and ribonucleic acid (RNA).

Next it seemed expedient to carry out such quantitative examinations as would give information on the nucleic acid content of extract P_1. In the P_1 material gained by a further extraction the DNA content was 15,25 per cent (Dische); the amount of pentoses (arabinose and D-ribose), 13,3 per cent; reducing materials amounted, reckoned as glucose to 62 per cent; the nitrogen content to 3,2 per cent; and the amount of phosphorus to 2,32 per cent. Nucleic acid from thymus and yeast (B. D. H. and Merck) served as control.

From the results of the chemical analysis and the paperchromatographic studies it can be established that extract P_1 contains mainly DNA. After acid hydrolysis, however, the sugar component of DNA is no longer demonstrable by chromatographic analysis, owing to the excessive lability of desoxyribose [39]. The spot of moderate intensity, which corresponds to D-ribose in the chromatogram, indicates traces of RNA. The considerable DNA content of extract P_1 and the well-known biological activity of nucleic acids [40] justify further inquiries into the nucleic acid, primarily the DNA content of extract P_1,and into the role it plays in the specificity of erythrocytes.

In knowledge of the chemical composition, the above considerations gave rise to the question whether DNA was present in extract P_1 as a contami-

nation only, or whether it was a closely connected part of the molecule responsible for the specificity of the erythrocyte. Specific precipitation of nucleic acid and serological examination of the sediment and the supernatant seemed to be means by which to decide the question. It should be noted in this connection that while precipitation with lanthanum nitrate yielded an abundant floccular precipitate in extract P_1, no precipitate was formed in extract P_2. Table VI shows the sensitizing capacity of the 50 mg per 100 ml dilution of extract P_1, as well as that of the fraction precipitated and decomposed with lanthanum, finally that of the supernatant freed from lanthanum.

Table VI

Sensitizing capacity of P_1 extract, of DNA fraction separated with La,and of supernatant in case of erythrocytes in amount of 1 per cent

	Serum dilutions						
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
50 mg of P_1 per 100 ml	++++	++++	++++	++++	++++	+	—
DNA fraction	++++	++++	++++	++++	++++	—	—
Supernatant	++++	++++	++++	+++	—	—	—

The data in Table VI reveal that the fraction obtained by specific precipitation of nucleic acid possesses a sensitizing capacity almost identical with the original extract P_1, and that the supernatant, too, contains the material responsible for sensitization, although in a substantially smaller amount.

Table VII

Inhibitory capacity of extract P_1, of DNA fraction separated by La, and of supernatant when using serum eight times the concentration of the titre dilution

	Dilutions of the extracts						
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
50 mg of P_1 per 100 ml	—	—	—	+	+++	++++	++++
DNA fraction	—	—	—	++	+++	++++	++++
Supernatant	—	+++	++++	++++	++++	++++	++++

Table VII shows the inhibiting capacity of the same materials as Table VI, using a serum eight times more concentrated than the titre dilution. It appears again that the original extract P_1 inhibits the agglutinating serum in almost the same order of magnitude as the nucleic acid fraction, while the inhibiting capacity of the supernatant is considerably decreased. Consequently, these observations greatly support the assumption that the DNA component of extract P_1 is a closely connected part of the molecule responsible for the specificity of the erythrocytes.

The question of the serological homogeneity of extract P_1 also merits attention. It was investigated by means of absorption tests. Extract P_1 absorbed by erythrocytes was found to inhibit the agglutinating serum to almost the original extent. The absorption tests seem accordingly to prove that a significant part of the extract consists of a non-adsorbing polysaccharide with the factor responsible for the specificity of erythrocytes being present in a small proportion only. This means that extract P_1 cannot be considered homogeneous.

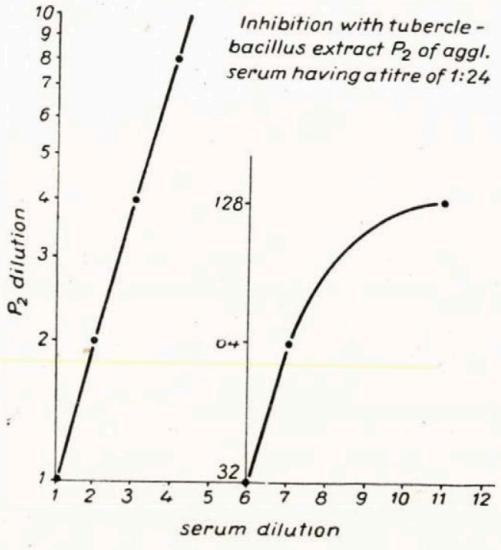


Fig. 4

The serological activity of the materials of polysaccharide character isolated from tubercle bacilli with two different methods, i. e. by slight or rough interference, proved to be different. It may be assumed that, as possible antigens, they are responsible for the production of two antibodies of different character. It seemed therefore necessary to inquire into the homogeneity of the antibody, by means of absorption tests. Summing up the results, it can be stated that serum absorbed by extract P_2 is no longer capable of agglutinating sensitized erythrocytes, while serum absorbed by sensitized erythrocytes, viz. the component capable of adsorption, no longer neutralises the inhibition capacity of P_2 extract. On the basis of absorption tests the antibody can accordingly be regarded as homogeneous.

The method of specific inhibition of the agglutinating serum proved to be suited also for studying the quantitative conditions of antigen-antibody fixation. The fact that dilutions of the «antigen» did not fix the antibody added to it in a measure proportional to the degree of dilution, rendered a closer examination of the question necessary. Fig. 4 represents the real correlations with

the serum dilutions on the abscissa and the dilutions of extract P_2 on the ordinate, latters in logarithmic scale. The original of the ordinate indicates the highest dilution of extract P_2 still capable of inhibiting non-diluted serum. The terminal section of the curve has been represented by transposition of the ordinate (Fig. 4). This correlation is expressed by a straight line, which suddenly levels out at dilutions near the serum titre.

Discussion

Numerous authors have been engaged in studying the materials of tubercle bacilli, especially in the problem of isolating specific polysaccharides. Their methods differed, and so did their results. From the point of view of the present study, those of the numerous communications are of particular interest which, in addition to the chemical analysis of the extracts, report their serological or biological activity as well. In this connection, the studies of *Zinsser* and *Parker* [17], *Mueller* [18], *Masucci* [19], *Heidelberger* [20], *Seibert* [21], and *Haworth et al.* [22] need to be mentioned. As regards comparing and assaying results, a point meriting special consideration is the observation made by *Seibert* [23], as well as by *Anderson* [24], that the results of chemical analyses differ not only with the several variants of a strain used as the basic material for isolation, but also from case to case. In this connection, those studies of *Heidelberger* [20], must be mentioned in which he succeeded to prove *genus-specificity only* in human, bovine, and avian type tubercle-bacilli polysaccharides.

The new aspect, the phenomenon of erythrocyte adsorption, and its closer study made it necessary further to investigate into the specific polysaccharides of tubercle bacilli. The methods applied have made it possible to discover new useful data. Thus could it be established that the final composition and the serological activity of the extract were decisively influenced by the preparative procedure employed. *Slight extraction* of tubercle bacilli made it possible to prepare such material as renders erythrocytes specific, when adsorbed onto them. Extracts gained by *rougher interference* were found to be less active, to possess no adsorbing capacity, yet to be still able to neutralize the antibody. These experimental results agree well with the earlier observations by *Schaeffer* [16], that the «complex» extract obtained by milder interference could also fix the complement, while the protein-free «simple» extract acted merely by precipitation. *Haworth*'s [22], as well as *Stacey* and *Kent*'s [25], studies undertaken on polysaccharides extracted from tubercle bacilli with urea, yielded similar results. Serological investigations and chemical analysis afforded also possibilities of making ourselves familiar with certain details of the correlation existing between function and structure. It could be estab-

lished that extract P_1 capable of adsorption was the more complex, and contained DNA in an amount of 15,25 per cent. Along with the D-ribose identified in the hydrolyzate of extract P_1, galactose and arabinose were also demonstrable by means of chromatographic analysis. In extract P_2, on the other hand, only the presence of the two last-mentioned sugars could be proved. But as extract P_3, which in its bulk contains arabinose only, inhibits the agglutinating serum to the same extent as extract P_2, it may be assumed that for the serological activity the pentoses are responsible, as also supported by the above mentioned studies of *Masucci* [19], who maintains that the precipitin titre is to be regarded as the index of pentose concentration, and, further, by the experiments of *Heidelberger et al.* [20], according to whom the activity of a polysaccharide runs parallel with its pentose content. Accordingly, these authors hold the pentoses responsible for the serologic activity.

According to the results of the sensitizing and agglutination-inhibiting experiments described, neither extract P_2 nor extract P_3, which latter contains only pentose (arabinose), possess any sensitizing capacity. From this it follows that for the erythrocyte adsorption one cannot hold responsible those factors, whose role in serological reactions of another character had been confirmed, amongst others by the experiments of *Masucci* [19] and of *Heidelberger* [20]. The analytical results of extract P_1 however, aroused our interest in another direction. The DNA content of the extract pointed to the necessity of examining the role played by DNA in the mechanism of adsorption, and of deciding whether it was instrumental in rendering the erythrocytes specific, and, if so, whether this instrumentality was a direct or indirect one. The results of our pertaining experiments furnished evidence that with specific precipitation of nucleic acids by means of it was possible to precipitate from the solution the major part of the material responsible for sensitization. True, there was a small amount of sensitizing extract left over, but this was no longer precipitable with lanthanum, and gave a negative *Dische*'s test. It may be assumed that in the DNA-free solution nucleotides or nucleosides, which cannot be precipitated with lanthanum [22], are bound to the polysaccharide, and that they are still capable of completing the adsorbing capacity of the polysaccharide. This would tend to show that DNA or its degradation products participate directly in the mechanism responsible for the specificity of the erythrocyte. It is equally possible that their role is an indirect one, and their presence merely an indicator of the quality accountable for the sensitization of the polysaccharide. Further experiments are required to clear up the situation and to decide, on the one hand, whether the sensitizing material precipitated with lanthanum nitrate consisted purely of DNA, or contained some other carbohydrate components ; and on the other hand, whether the small amount of Dische-negative sensitizing material demonstrable in the supernatant was made up of the polysaccharide only, or had nucleotides, or possibly nucleosides, bound to it.

As to the other properties of extract P_1, absorption experiments showed that it was not homogeneous. In addition to the factor responsible for the specificity of the erythrocytes, it was found to contain non-sensitizing materials inhibiting agglutination.

According to the experimental data of *Heidelberger et al.* [20], the two fractions of the polysaccharide they isolated, which in essence were similar to extracts P_2 and P_3 absorbed by two different antibodies. It was not possible to demonstrate this with the methods of erythrocyte agglutination and specific inhibition. Absorption experiments conducted with these methods showed the antibody to be homogeneous, equally capable of combining with both types of extract.

Results of investigations into the quantitative conditions of antigen-antibody fixation clearly proved the sensitivity of the serological methods applied. Thus could it be established that the amount of the antibody fixed by antigen dilutions increasing in geometric series, was changing in arithmetical progression. On logarithm paper, this correlation is expressed by a straight line which levels out suddenly at dilutions near the amounts of the titre.

The sensitive and specific method of agglutinating erythrocytes rendered specific by bacterial polysaccharides is being ever more extensively applied in the diagnosis and immunobiological studies of infectious diseases [26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 and 36]. Apart from its diagnostic usefulness there are also practical reasons which justify a closer study of the method. Thus it is clinical observations, and experiments undertaken on their basis, which speak in favour of the view that bacterial polysaccharides become adsorbed onto the surface of erythrocytes not only *in vitro*, but in the case of infectious diseases also *in vivo*, and by injuring the red blood corpuscles elicit the syndrome of infectious anaemia [37, 38].

Summary

With the haemagglutination test described by *Middlebrook* and *Dubos* and by specific inhibition of agglutination, two different specific components were demonstrable in commercial old tuberculin (Phylaxia, Budapest). The one adsorbing onto erythrocytes rendered them specific, the other was unable to achieve this, but was capable of inhibiting the agglutinating serum.

From heat-killed dried tubercle bacilli two specific polysaccharides were separated by different methods. Extraction of the polysaccharide with methanol buffer solution was considered to be a slight interference. The polysaccharide (P_1) precipitated with alcohol, and purified, appeared as a yellowish-white amorphous powder. Separation of the polysaccharide by alkaline hydrolysis was regarded as a rougher interference. For the polysaccharide obtained after precipitating

with alcohol and further purifying the symbol P_2 was used if the hydrolysis was carried out with 0,5 N NaOH, and the symbol P_3 was applied after hydrolysis with N NaOH.

The polysaccharide P_1 was found to possess sensitizing capacity and to inhibit the agglutinating serum. Extracts P_2 and P_3 possessed only inhibitory effect.

Chemical analysis revealed extract P_1 to contain 12,25 per cent DNA, 2,36 per cent phosphorus, 3,2 per cent nitrogen, and to be negative yield a biuret test. The pentose content expressed in arabinose, was 13,3 per cent, reducing materials amounted in it to 62 per cent, $[\alpha]_D^{18} = 97{,}5°$, the neutral equivalent = 8300. Chromatographic analysis showed the extract to contain galactose, arabinose, and D-ribose. By electrophoresis only two components of different mobility were demonstrable. The architecture of extracts P_2 and P_3 was found to be simpler: they contained no DNA. Extract P_2 consisted of galactose and arabinose, extract P_3 of arabinose alone.

Following fractionation of extract P_1 with lanthanum nitrate, it could be established by serological examination of the nucleic acid part and the DNA-free solution that DNA was a closely connected part of the molecule responsible for sensitization. The DNA fraction was observed to sensitize to the same extent as the original solution, but even the DNA-free solution contained a small amount of sensitizing material that could not be precipitated with lanthanum.

By means of absorption experiments it could also be proved that extract P_1 was not homogeneous. It uniformly contained both the sensitizing and the inhibitory materials. The antibody could be regarded as homogeneous, because it combined equally with both types of extract.

The method of specific inhibition of agglutination was found suitable for determining the quantitative conditions in the antigen-antibody fixation. The amount of antibody fixed by dilutions of extract P_2 increasing in geometric series, changed in arithmetical progression.

LITERATURE

1. *Middlebrook, G.* and *Dubos, R. J.:* J. Exp. Med. **88,** 521 (1948).
2. *Landsteiner, K.:* The Specificity of the Serological Reactions, Cambridge, Harvard Univ. Press 1945, p. 144.
3. *Földes, J.* and *Köröși, S.:* Orvosi Hetilap **42,** 1189 (1952).
4. *Stern, K. G.* and *Steinberg, M. A.:* Biochim. Biophys. Acta **11,** 553 (1953).
5. *Bukantz, S. C., Rein, C. R.* and *Kent, J. F.:* J. Lab. Clin. Med. **31,** 394 (1946).
6. *Morris, D. L.:* Science **107,** 254 (1948).
7. *Kabat, E. A.* and *Mayer, M. M.:* Experimental Immunochemistry, Charles C. Thomas Publisher, Springfield, 1948.
8. *Pregl, F.:* Die quantitative organische Microanalyse, S. 120, Berlin, 1930.
9. *Meybaum, W.:* Zschr. Phys. Chem. **258,** 117 (1939).
10. *Dische, Z.:* Microchemie **8,** 4 (1930).
11. *Harwey, H. W.:* The Analyst **78,** 110 (1953).

12. *Horrocks, R. H.* and *Maning, G. B.:* Lancet **256,** 1042 (1949).
13. *Partridge, S. M.:* Nature **163,** 443 (1949).
14. *Consden, R.* and *Stanier, W. M.:* Nature **169,** 783 (1952).
15. *Keogh, E. W.:* Nature **161,** 687 (1948).
16. *Schaeffer, W.:* Ann. Inst. Pasteur **72,** 783 (1946).
17. *Zinsser, H.* and *Parker, J. T.:* J. Exp. Med. **37,** 275 (1923).
18. *Mueller, J. H.:* J. Exp. Med. **43,** 9 (1926).
19. *Masucci, P., McAlpine, K. L.* and *Glenn, J. H.:* Am. Rev. Tuberc. **22,** 667, 678 (1930).
20. *Heidelberger, M.* and *Menzel, A. E. O.:* Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **29,** 631 (1932) and J. Biol. Chem. **118,** 79 (1937), **127,** 221 (1939), **137,** 189 (1941).
21. *Seibert, F. B.* and *Watson, D. W.:* J. Biol. Chem. **140,** 55 (1941) and J. Immunol. **45,** 179 (1942).
22. *Haworth, N., Kent, P. W.* and *Stacey, M.:* J. Chem. Soc. 1211 and 1220 (1948).
23. *Seibert, F. B.:* Am. Rev. Tuberc. **59,** 86 (1949) and J. Am. Chem. Soc. **72,** 2678 (1950).
24. *Anderson, R. J., Peck, R. L.* and *Creighton, M. M.:* J. Biol. Chem. **136,** 211 (1940), **171,** 749 and 761 (1947).
25. *Stacey, M.* and *Kent, P. W.:* Biochim. Biophys. Acta **7,** 146 (1951).
26. *Harris, T. N.* and *Harris, S.:* J. Bact. **66,** 159 (1953).
27. *Neter, E., Bertram, L. F.* and *Arbesman, C. E.:* Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **79,** 255 (1952).
28. *Landy, M.* and *Lamb, E.:* Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **82,** 593 (1953).
29. *Neter, E.,* and *Gorzynski, E. A.:* Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **85,** 503 (1954).
30. *Shin Man Chang:* J. Immunol. **70,** 212 (1953).
31. *MacEntegart, M. G.:* J. Clin. Path. **5,** 275 (1952).
32. *Wright, G. C.* and *Feinberg, R. J.:* J. Immunol. **68,** 65 (1952).
33. *Fischer, St.:* J. Hyg. **50,** 445 (1952).
34. *Boyden, St.:* Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **73,** 289 (1950).
35. *Warburton, M. F.:* Med. J. Austral. **1,** 135 (1949).
36. *Edlinger, E.* and *Vienchange, J.:* Ann. Inst. Pasteur **84,** 384 (1953).
37. *Sandage, C., Brandt, N.* and *Birkeland, J. N.:* J. Infect. Dis. **88,** 9 (1951).
38. *Boyden, St. V.:* Nature **171,** 402 (1953).
39. *Chargaff, E., Vischer, E., Doniger, R., Green, Ch.* and *Misani, F.:* J. Biol. Chem. **177,** 405 (1949).
40. *Zamenhof, St.:* Canad. J. Med. Sci. **31,** 252 (1953).

О СВОЙСТВАХ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ПОЛИСАХАРИДОВ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ПАЛОЧКИ

Й. Фёльдеш

Р е з ю м е

Методом гемаглютинации, описанным Мидльбруком-Дюбо, (Middlebrook-Dubos) и путем специфического торможения аглютинации, в торговом старом туберкулине (Филаксия, Будапешт) можно обнаружить два различных специфических компонента. Один из компонентов, адсорбируясь к эритроцитам, делает их специфическими, другой же не обладает такой способностью, но может тормозить аглютинирующую сыворотку. Это экспериментальное наблюдение послужило основой для проведения нижеописанных исследований, целью которых является освещение все чаще применяемого в практике метода.

Выделение двух специфических полисахаридов различной активности из убитых нагреванием сухих туберкулезных палочек удалось двумя различными методами. Слабой обработкой является извлечение полисахарида буферным раствором, содержащим метиловый спирт. Осажденный спиртом и очищенный полисахарид представляет собой желтовато-белый аморфный порошок, означаемый P_1. Более грубой обработкой считается выявление полисахарида путем гидролиза в щелочной среде. В гидролизате осаждение специфических веществ производилось с помощью алкоголя. Полученный после очистки экстракта полисахарид, раскрытый с помощью 0,5 *n* NaOH получил обозначение P_2, а выявленный путем гидролиза произведенного с *n* NaOH — обозначение P_3.

Полисахарид, полученный путем слабой обработки, сенсибилизирует эритроциты и тормозит аглютинирующую сыворотку. Изолированные грубой обработкой экстракты P_2 и P_3 обладают только тормозящей способностью.

Путем химического анализа можно было определить, что экстракт P_1 содержит 15,25% дезоксирибонуклеиновой кислоты (DNA), 2,36% фосфора, 3,2% азота и дает отрицательную биуретовую реакцию. Содержание пентозы (арабинозы) составляет 13,5%, редуцирующих веществ — 62% ($\alpha/\frac{18}{D} = 97,5°$, нейтральный эквивалент = 8300). Хроматографическим анализом определено наличие галактозы, арабинозы и *D* — рибозы. Путем электрофореза можно обнаружить только два компонента различной подвижности. Построение экстрактов P_2 и P_3 является более простым: не содержат DNA. Экстракт P_2 состоит из галактозы и арабинозы, а экстракт P_3 содержит только арабинозу.

После фракционирования экстракта P_1 азотнокислым лантаном были произведены серологические исследования части, содержащей DNA и раствора, не имеющего DNA. Исследования показали, что DNA является тесно связанной частью сенсибилизирующей молекулы. Фракция DNA сенсибилизирует в одинаковом с исходным раствором размере, но и лишенный DNA раствор тоже содержит малое количество сенсибилизирующего вещества, не выделяющегося посредством лантана.

На основе опытов истощения возможно было определить, что вещество P_1 не является гомогенным. Оно содержит и сенсибилизирующие и тормозящие вещества. Антитела могут считаться гомогенными, так как одинаково связываются с экстрактами обоих типов.

Метод специфического торможения аглютинации может применяться для определения количественных соотношений связывания антигенов-антител. Количество антител, связываемых повышающимися в геометрическом порядке разведениями экстракта P_2, изменяются в арифметическом порядке.

RESEARCHES ABOUT THE VIABILITY AND PRESERVATION OF THE CONIDIA OF CLAVICEPS PURPUREA (FR.) TUL., GROWN IN SUBMERGED CULTURE

By

E. T. GLÁZ

Pharmaceutical Industrial Research Institute, Budapest

(Received September 10, 1954)

The production of ergot in large quantities and adequate quality was made possible by the infection of rye plants with the spores of Claviceps purpurea, mainly since the successful theoretical and practical solution of the problem by *Békésy*. For rye-infection the ascospores of Claviceps purpurea (C. p.), the diluted honey-dew or the conidia grown in an artificial culture, can be used. Numerous researchers were interested in the cultivation of C. p. on artificial media since *Tulasne* [1] had first described the fungus in detail. Several authors (2—12) employed conidia grown on an artificial medium for the purpose of rye-infection ; the conidia used were grown in surface cultures, on agar- or fluid media and on moistened cereal grains, respectively. We elaborated a simpler and less expensive method, namely the submerged production of conidia ; the method as well as the experimental rye infections with these conidia have been described elsewhere [13]. In recent years *Sim* and *Youngken* [14], *Michener* and *Snell* [15], *Berman* and *Youngken* [16], and *Tyler* and *Schwarting* [17] accomplished the shaking culture of C. p., but they did not investigate the conidium production and the charcteristics of conidia grown in submerged culture.

The longevity of conidia obtained in submerged culture, however, was insufficient for the requirements of the operations of rye infection. Therefore we investigated the viability of the conidia, and the methods suitable for its prolongation, if possible.

Methods

Origin of strains. The greater part of the C. p. strains used in the experiments were supplied by Dr. *M. Békésy* (Research Institute for Medicinal Plants, Budapest), while the other part was isolated by us. The cultures were made in all cases by inoculating a part, aseptically removed from the inner pseudo-parenchymatous tissue of the sclerotium on agar medium, or in some cases by isolating single colonies by spreading the cultures obtained in the above manner.

Shaking culture. Conidia grown in shaking culture and partly in a fermentor were chiefly used in the experiments. The shaking cultures were made in 500 ml Erlenmayer flasks with 100 ml of medium ; the flasks were sterilized for 15 minutes at 120° C and shaken on a rotary shaker operating 90 to 120 r. p. m. during the experiments.

The number of conidia was determined in a Bürker chamber and in some cases compared with data, obtained by spreading. According to our experiences the count obtained in the Bürker chamber has a scattering of ±10 to 20 per cent.

Preparation of hanging drops. The viability of conidia was estimated in a hanging drop, according to their power of germination at +25° C. The rate of germination — following the microscopical survey of the whole hanging drop — was evaluated in per cents at 24, 48 and 72 hours. Thus the figures obtained in this way do not represent an absolute value but only an approximate one. In order to ensure an abundant supply of oxygen during the 3 days of the investigation, chambers constructed by means of rings 18 mm high and 14 mm in diameter, slides, and cover slips were used, instead of the usual hollow-ground slides. A few drops of water were placed at the bottom of the chamber to prevent drying.

A liquid culture medium containing 2,5% sorbitol and 1,5% corn steep solids, made transparent by boiling and filtering were used for the hanging drops.

Sugar determination was made by the Bertrand and *N determination* by the Kjeldahl methods.

Fig. 1. 1 and 2 show conidia becoming just abstricted, 3 shows a large separated conidium. Enlargement 1200x

Characteristics of the conidia

Microscopic picture. The conidia obtained in submerged culture are oval-elliptical polymorphous, homogeneous, but smaller or larger granules or vacuoles are frequently visible in them (Fig. 1).

Size. Conidia grown in submerged culture are generally more polymorphous and larger than those grown on agar surface [5] or those of the honey-dew [4]. Their dimensions are 2,5—6,5 by 4,0—15,0 (exceptionally 17—18), mostly 3,0—4,5 by 6,0—10,0 μ.

Origin. Some conidia are abstricted from the tip of short stems (sterigmata?), others from the side of the hyphae (Fig. 1); it is, however, probable that the strongly divisioned hyphae might fall apart like athrospores, and that some of the large conidia might divide into smaller ones, considering that the average size of conidia decreases with time. These two latter modes of origin could not be definitely observed, owing to the rapidity of development in shaking culture. In the present paper the asexual spores of Claviceps purpurea are, — although with reservation — always termed conidium, considering that the same term had previously been used by all authors. At germination of the conidium the germ tube is usually formed on one of the poles, but frequently two or more germ tubes originate from the same conidium, at both of the poles.

Chemical composition. From shaking culture which has attained its maximum conidium number, the mycelium was filtered through gauze and the conidia passed with the liquid were twice washed by centrifugation. The moisture content of such conidia amounted to 70—76%. Data referring to their chemical composition are shown in Table I.

Cramer [18] found the water content of fungal spores to be 38,8 per cent compared with the average 80 per cent water content of the vegetative forms of fungi and bacteria. With their high water content, the conidia of Claviceps purpurea resemble rather the vegetative forms, than other fungal spores. It will be seen that as regards their preservability they behave in a similar way.

Table I

Chemical composition of suspensions of washed conidia

In the suspension, g/100 ml		% of the dry material of conidia
Dry substance	0,772	100
Total N-content	0,080	10,4
Sugar content	0,090	11,6
Ash content	0,083	11,0
In another case the moisture content of centrifuged conidia was		70,7
the dry substance was		29,3

(The shaking culture from which the conidia used for the determination originated did not contain solid constituents any longer, because the fungus has already dissolved them in the course of its growth. The conidia were filtered through gauze, centrifuged and washed twice with, and suspended in distilled water. The number of conidia in the suspension was 600,000/mm^3. Sugar determination was made after hydrolysis with HCl.)

Results

Preservation of the conidia of C. p. was attempted first by drying. The application of drying seemed practical, because they are chiefly the spores that withstand drying for a long time. The drying over P_2O_5 or on sand of C. p. conidia from agar surface culture, as well as their freeze-drying was tried by *Békésy* and *Uskert* [19], but in their experiments the conidia were destroyed at every time.

We also tried drying over P_2O_5 at room temperature under both normal pressure and vacuum, as well as drying in a sterile air-flow. After these procedures the conidia no longer germinated in medium. Freeze-drying proved also unsuccessful, irrespective of whether the conidia were suspended in their own culture fluid or — after washing — in distilled water. When the ampoule previously exposed to freeze-drying, was opened and stored in a vapour-saturated place for 24 hours before examination, the result was also negative.

Heller [20], *Pauli* [21] and *Proom* [31] have reported that bacteria remain viable much longer if dried in the presence of some (hydrophil?) colloids such as broth, peptone, serum, gelatin or of sugar-solution, than if dried in an aqueous suspension. On this basis *Békésy et al.* [19] carried out freeze-drying in the presence of sugar, salt and egg albumin, and we have also tried freeze-drying of conidia from a suspension containing 20% saccharose or 10% beef serum. The material was frozen with CO_2 snow, dried at about 0,4 mm Hg pressure and sealed under vacuum. In the majority of cases the conidia died. The destruction of conidia at freeze-drying cannot be attributed to the freezing — as will be shown further. Only from a few sugar suspensions or honeydew

did the conidia germinate after freeze-drying; it is, however, thought that in this cases drying was not perfect. When such «surviving» preparations were stored at +25° C, the conidia died within a few days. The freeze-drying of honey-dew was accomplished for comparison and partly because *Novák* [22] observed that sphacelia (the mycelial growth of C. p. on rye, which consists chiefly of honey-dew, rich in conidia and sugar) withstand freeze-drying and might thus be preserved. As stated, already *Bonorden* [23] found the conidia of dried sphacelia to be viable. We ourselves have not dealt with the preservation of sphacelia, but investigated the viability of the conidia of the socalled «cap», the dry residue of the sphacelia and located on the tip of the sclerotium; we pulverized aseptically some «caps», originating from sclerotia which were kept for 12 months at room temperature and — after suspending in water — inoculated it on medium. The suspension contained conidia abundantly, but they did not germinate.

Table II

Germination in hanging drop of conidia, stored under different conditions

Sign	Method of storage	Germination in %, after storage for								
		0	4	7	12	19	42	70	134	188 days
398	+2—4° C.....	90,100	80,100	—	—	95,100	95,100	95,100	—	—
398	+25° C.....	90,100	70,100	50,100	5,40,90	0	—	—	—	—
398	Quick-freezed.....	90,100	90,100	90,100	95,100	95,100	95,100	95,100	—	—
420	Quick-freezed.....	80,100	—	—	—	—	—	85,100	70,100	80,95

The successive numbers indicate the percentual rate of germination at the 24th, 48th and 72th hour of incubation of the hanging drops.
Conidia from shaking culture, suspended in their own culture fluid.
Laboratory mark of the stain used: 51/1.

Subsequent to the failure of the drying method, preservation in liquid suspensions was studied. Kept in a liquid suspension in a refrigerator at +2—4° C, conidia from shaking cultures germinated at an unaltered rate after a period of 2 months (Table II). The longest period over which conidia kept in the refrigerator were investigated was 3 months, at the end of which time the rate of germination was still satisfactory. Although the germination of conidia stored for 2 to 3 months always reached 100% within 3 days, in some cases it started more slowly than in the cases shown in Table II. Such divergences vary from experiment to experiment and their cause is unknown. (Since no essential difference was found in the germinating power of conidia of shaking cultures grown on different kinds of media, the majority of experiments was carried out with conidia grown in a medium containing 2,5% sorbit o and 1,5% corn steep solids, this composition being the most suitable for conidium production.) The influence of washing on the germinating power of conidia

was also investigated, the question being, whether the suspension could be better preserved in its own culture fluid or washed. Washing was effected with distilled water or with physiological NaCl. Washed and unwashed conidia germinated equally after a short storage. In some experiments of longer storage also, there was no difference in the rate of germination, on the other hand in others a slight difference appeared with favour to the washed conidia.

The longevity of conidia is considerably shorter at higher temperatures. From the corresponding data of Table II and IV it is apparent that when suspensions are kept at +37° C, germination will not occur after more than 1 or 2 days and after one day it is already diminished. At +25° C conidia germinate for 8 to 16 days (varying according to experiments), but already on the first days the intensity of germination is not the same as before the storage. Thus viability rapidly decreases with the rise of temperature. *McCrea* [5] observed rapid destruction of C. p. cultures at + 37° C, and others had similar experiences with spores of other fungi exposed to temperatures higher than their germination optimum [24].

The longevity of conidia of shaking culture, filtered from their mycelium, differs from that observed with those of surface culture. *Meyer* [25], *Stäger* [39], *Bonns* [26] found the cultures viable after about 1 year, while McCrea even after 4,5 years. With an agar surface culture about half a year old we also observed normal growth. On the other hand, *Dim—Zajec* [12] found that only cultures not older than 4 weeks are suitable for rye-infection, and *Békésy* [27] observed the senescence of agar cultures within a few months. The viability of conidia grown on moistened rye seeds decreases 50 per cent within 3 months. But the longevity of conidia grown in shaking cultures is even less. The reason for this could be sought in the conditions of submerged cultures (aeration, higher metabolism, etc.).

In the following we looked for a safe method for prolonged preservation of conidia grown in submerged culture. Since the viability of conidia may be increased by decreasing the temperature, the application of quick-freezing seemed suitable.

Numerous reports deal with quick-freezing of microorganisms. The behaviour at low temperatures of different microorganisms being not identical, it cannot be foretold how a certain microorganism will respond to quick-freezing, viz. to preservation in a frozen state. *McFadyen* [28] as well as *Paul* and *Prall* [29] examined bacteria frozen with liquefied air of —182—250° C, and maintained at this temperature for 7 days, and found shape and viability unaltered for a long time after thawing. The vegetative forms of some fungi and yeasts also withstand temperatures of —192° C [30]. The high resistance of spores to quick-freezing has also been observed.

According to *Weiser* and *Osterund* (cit. 31), the degree of destruction associated with freezing is made up of two factors : the first, taking place at the time of freezing is only slight and independent of temperature; the second is due to storage in the frozen state and is correlated with temperature and time. Recently, since the fundamental work of *Haines* [32], at variance with the earlier conception of intracellular crystal formation, denaturation of proteins and flocculation of them following thawing are considered as the cause of the destruction. It was *Haines* who demonstrated that bacteria are killed more rapidly at —1, —2° C than at —20° C, and also *Noskova* [33] found the rate of destruction of yeasts to be lower at —30° C than at

—11° C. Destruction caused by freezing may also be due to crystal formation in the medium, which dehydrates the cells, to oxidation of some vital substances of the microorganisms or to autolysis of certain bacteria (especially cocci) after thawing [34]. Quick-freezing in the presence of sugar or glycerol results in a lower rate of destruction [31].

As to the duration of storage, *Winchester* and *Murray* [35] found living bacteria even after 19 months at —190° C. *Turner* [36] found viable and virulent Treponema pallidum and viruses after a 6 months' storage at —78° C. An adequate method for the storage of bacteria and filterable viruses is their preservation at —70° C [37]. Overwintering in the field of the sclerotium of C. p. is a well-known fact.

Békésy, *Uskert* and *Balázs* [19] investigated the quick-freezing of agar cultures of C. p., with good results. We realized quick-freezing of conidia from shaking cultures in test tubes containing 2 to 5 ml of suspension, by exposing them to air of —33—40° C. After freezing, the material was stored at a temperature of about —20° C. Tests carried out from time to time showed (Table II) that conidia preserved in a frozen state for 6 months germinated with the same intensity as fresh ones. In the material preserved in frozen state over 41 days, the number of viable conidia, counted by spreading, was practically identical with the total conidia count, found in the Bürker chamber (Table III). In the course

Table III

Comparison of the number of living conidia and total conidia count of an aqueous suspension, stored in refrigerator and by quick-freezing

Sign	Method of storage	Number of conidia after storage for 41 days	
		in Bürker chamber	by spreading
420	+2—4° C	78,000/mm³	70,500/mm³
420	Quick-freezing	76,500/mm³	52,000/mm³

Laboratory mark of the C. p. strain used : 51/1.
Conidia grown in shaking culture, suspended in the culture fluid itself.

of these investigations there arose another interesting and favourable fact, viz. at +25° C the germinating power is later lost of a material previously quick-freezed, than of an other one previously stored in refrigerator for the same time. In the first case the rate of germination is identical with that of freshly prepared cultures. Quick-freezing was carried out with both washed and unwashed conidia as well as with conidia suspended in sugar solution. Their longevity proved identical. Thus, quick-freezing of conidia comprises a safe method of storage, making possible to preserve the rye-infecting material in an un altered state, from its production until its use.

The other difficult problem to be solved was how to increase the heat toleration of conidia, because in the course of the operations of rye infection — lasting possibly 3 to 4 weeks — (in Hungary in the month of May) the outside temperature might increase to as much as +30° C, at which temperature the conidia might die. Experiments were undertaken, starting from the fact that during the sphacelial stage the conidia of the honey-dew on the rye are capable

Table IV

Germination in a hanging drop of conidia, suspended in aqueous and sugar solution as well as of conidia of the natural honey-dew, after storage at different temperatures

Meduim	Storage temperature	Germination in %, after storage for								
		1	2	5	7	11	18	26	31	40 days
Water	+2—4°C	—	70,100	90, 100	—	70, 95, 100	—	90, 100	70, 100	—
Sugar solution	+2—4°C	—	—	90, 100	—	40, 90, 100	—	90, 100	70, 100	—
Honey-dew	+2—4°C	—	—	90, 100	—	90, 100	—	90, 100	—	15, 50, 100
Water	+25°C	—	—	10, 100	1, 20, 60	0, 0, 0	0, 0, 0	—	—	—
Sugar solution	+25°C	—	—	90, 100	—	50, 90, 100	70, 90, —	30, 90, —	20, 80, —	—
Honey-dew	+25°C	—	—	90, 90, —	—	10, 70, 100	—	0, 2, 20	—	0, 0, 0
Water	+37°C	0, 20, 20	0, 1, —	0, 0, 0	0, 0, 0	—	—	—	—	—
Sugar solution	+37°C	40, 90, 100	10, 90, 100	1, 20, 80	5, 40, 100	0, 0, 0	—	—	—	—
Honey-dew	+37°C	—	—	90, 100	—	0, 0, 0	—	—	—	—

The significance of numbers as in Table II.

Conidia from a freshly prepared shaking culture were used. Laboratory mark of the strain: Ta 11.

Medium of the aqueous suspension was the own fluid of the culture. Conidia count of the suspension: about 500,000/mm³.

Saccharose content of the sugar solution: 65%. Conidia count 262,000/mm³.

Reducing sugar content of honey-dew prior to hydrolysis was 64%, after hydrolysis 65%. Conidia count 2.340,000/mm³.

to withstand the rays of the (often) glaring sunshine. Honey-dew is a thick solution containing reducing sugars. According to *Kirchhoff* [4], it is a 2,33 M solution in which *Fuchs* and *Pöhm* [38] found, in addition to some other sugars, mainly invert sugar. At first, it was tried to preserve the conidia in honey, but after an unsuccessful trial we experimented further with commercial sugar, saccharose. Saccharose in an amount roughly corresponding to the sugar content of honey-dew was added to conidia suspended in their own culture fluid. It is apparent from Table IV, that at +37° C by adding sugar, the germination power of the conidia could be increased from 1—2 days to 7 days, while at +25° C the germination percentage was the same for 30 days, as without sugar for 10—12 days. For comparison, on one occasion honey-dew was tested. It was found that on refrigeration and also at +25 or at +37° C, its germination capacity was preserved as long or for a somewhat shorter time, as of conidia of shaking culture and preserved in sugar solution. *Stäger* [39] found to be viable the conidia of honey-dew, adhesive on the tip of sclerotia, which were kept for 10 months in a dark, cool place. In our experiments honey-dew freshly collected from rye was used, and the destruction of its conidia was partly due to contamination with Yeast cells.

Among microorganisms there are several kinds tolerating highly hypertonic solutions ; for instance, *Stuart* [40] succeeded in culturing several kinds of bacteria in the presence of 30% NaCl and *Petrova* [41] isolated Micrococcus roseus from the water of the salt lakes. With respect to sugar tolerance, mainly yeasts were investigated. These are capable, according to species, to show vital- and enzymic activity even in the presence of 6 to 20, occasionally 60% sugar [42]. Aspergillus niger divides even in a 64% sugar solution *(Raulin*, cit. 42, p. 147).

In our experiences C. p. conidia remained viable for a shorter period in the presence of 10% NaCl than without it, thus for 19 days in the refrigeration, and for 4 to 5 days at room temperature. That is, in the case of preservation with sugar, the question is not only whether the conidia tolerate the high osmotic pressure. The sugar solution, probably, has also another function. It has been reported that various fungus spores retain their viability longer when enclosed in a fruiting body, than removed from it [24, p. 249] ; and it is probable that the role of the gelatinlike matrix of the conidia of Gleosporium, Colletrotrichum and Cystospora species is «to increase the longevity of the spores through its water-holding capacity» [43]. In the case of the conidia of C. p., the role of the hygroscopic sugar might be its water holding capacity and perhaps also its other biochemical and physico-chemical effects. The prolonged viability of conidia in concentrated sugar solution, — in addition to solving our problem, — gives an explanation of Stäger's experiments and also elucidates the fact how are the easily destroyable conidia of the natural honeydew able to withstand great heat.

We investigated in addition, whether antimicrobial agents could be used to control contamination with foreign microorganisms, which occurs frequently in suspensions containing conidia. This investigation was carried out by testing

the effect of these drugs on the germination of Claviceps conidia. From among the antibiotics, streptomycin and chloromycetin in a concentration of 1000 U/ml and penicillin of 100 U/ml did not inhibit the germination of conidia in a hanging drop, whereas 500 μg/ml of aureomycin inhibited it slightly, but in a lower concentration not at all. From antimycotic substances, sodium benzoate, sodium salicylate and sodium para-nitro-benzoate in concentrations of 1000 μg/ml inhibit germination, whereas in concentrations lower than 200 μg/ml they do not. 8-oxy-chinolin in concentrations of 40 to 200 μg/ml kills conidia and even in 8 μg/ml it inhibits their germination. In the shaking culture of C. p. 100 μg/ml of Nipagin inhibits the increase of conidia count. It follows that conidia suspensions can be protected with antibiotics from the majority of bacterial infections but not from mycotic ones, because the required concentrations of the antimycotic agents used inhibit also C. p.

Finally, it was studied whether or not the own alkaloids of ergot inhibit the germination of conidia, especially since according to *Sternon* [44], the alkaloids disappear from the ergot sclerotium after the fruiting bodies have developed. This indicates that the own alkaloids of C. p. play some role in its physiology. In our studies it was found that neither 12 to 200 μg/ml ergonovine maleate nor a mixture of crude ergot alkaloids corresponding to 5 to 80 μg/ml ergonovine maleate (Ergam, Kőbánya Pharmaceutical Works, Budapest) influence the germinating power of conidia.

Summary

The biology of the conidia of Claviceps purpurea grown in shaking culture and, above all, their germination in hanging drop cultures have been studied.

Conidia do not withstand drying and exposure to higher temperatures. A method for preservation of conidia by quick-freezing was therefore elaborated. In this way they remain unaltered for a long time. The heat toleration of conidia was increased by preserving them in a concentrated sugar solution. In this way the conidia of submerged cultures became suitable for the operations of rye infection.

On the basis of their water content and of their viability under different conditions, the Claviceps «conidia» (asexual spores) resemble rather the vegetative forms of fungi, than the fungal spores, termed by Vuillemin «conidia vera».

Acknowledgements. We express our thanks to Dr. M. Békésy (Research Institute for Medicinal Plants, Budapest) for the supply of the stock cultures and for placing his wide experiences at our disposal; to Dr. I. Lovrekovich, Dr. I. Horváth and A. Uskert (Pharmaceutical Industrial Research Institute, Budapest), for their valuable and useful advices; to the Mirelite Quick-freezing Enterprise (Budapest), for the quick-freezing operations; to the analytical Department of our Institute for the sugar and N determinations; and to Miss Catherine Steczek, Mrs. E. Nagy and Mrs. E. Rácz for their technical assistance.

REFERENCES

1. *Tulasne, M. L. R.:* Annales des Sciences Naturelles, Partie botanique III. S. Tome XX., 1853.
2. *Hecke, L.:* Schweiz. Apotheker Z. **59,** 277, 293 (1921), and **60,** 45 (1922).
3. *Tschermak, E.:* Deutsche Landw. Presse **49,** 175 (1922).
4. *Kirchhoff, H.:* Zbl. Bakteriol. II. Abt. **77,** 310 (1929).
5. *McCrea, A.:* Am. J. Botany **18,** 50 (1931).
6. *Krebs, J.:* Untersuchungen über den Pilz des Mutterkorns Clav. p. Tul., dissertation, Bern, 1936.
7. *Békésy, M.:* Hung. Pat. No. 112741, X/h, 1935; Zbl. Bakteriol. **99,** 321 (1938); Diss.: Kísérletügyi Közl. 41 : 1—6. füz. 1939.
8. *Hecht, W.:* Schweiz. Pat. No. 211619, 1940.; Pharm. Acta Helv. **19,** 112 (1944); Die Pharmazie **6,** 291 (1951).
9. *Stoll, A.:* Pharm. Acta Helv. **19,** 119 (1944).
10. *Schwarting, A. E.* and *Hiner, E.:* J. Am. Pharm. Ass. Sci. Ed. **34,** 11 (1945).
11. *Czetsch-Lindenwald, H. V.* and *Hauser, W.:* Öst. Apotheker Z. **3,** 630 (1949).
12. *Dim-Zajec, V.—Mastnak, A.:* Farm. Glasnik **7,** 1, 44 (1951).
13. *Gláz, E.:* M. T. A. V. Oszt. Közl. (Budapest). **6,** 65 (1955)
14. *Sim, S. K.—Youngken, H. W.:* J. Am. Pharm. Ass. Sci. Ed. **40,** 434 (1951).
15. *Michener, H. D.—Snell, N.:* Am. J. Bot. **37,** 52 (1950).
16. *Berman, M. L.—Youngken, H. W.:* J. Am. Pharm. Ass. Sci. Ed. **43,** 200 (1954).
17. *Tyler, V. E.—Schwarting, A. E.:* J. Am. Pharm. Ass. Sci. Ed. **41,** 590 (1952) and **43,** 207 (1954).
18. *Cramer, E.:* Arch. Hyg. **13,** 71 (1891).
19. *Békésy, M., Uskert, A.* and *Balázs, O.:* (Budapest), 1950, personal communication.
20. *Heller, G.:* J. Bact. **41,** 109 (1941).
21. *Pauli, P.:* Soc. int. Microbiol. Sez. Ital. **4,** 239 (1934).
22. *Novák, E.:* (Budapest), 1950, personal communication.
23. *Bonorden:* Bot. Ztg. **16,** 97 (1858).
24. *Gottlieb, D.:* Bot. Rev. **16,** 229, (1950).
25. *Meyer, B.:* Landw. Jahrb. **17,** 924 (1888).
26. *Bonns, W. W.:* Am. J. Bot. **9,** 339 (1922).
27. *Békésy, M.:* (Budapest), personal communication.
28. *McFayden, A.:* Proc. Roy. Soc. B. **66,** 180 and 339 (1900).
29. *Paul* and *Prall:* Arb. Reichgesundheitsamt. **26,** 73 (1907).
30. *Kärcher, K.:* Planta (Berlin) **14,** 515 (1931).
31. Abstract of Meeting of the Soc. Appl. Bacter., Nature **168,** 990 (1951).
32. *Haines, R. B.:* Proc. Roy. Soc. B. **124,** 451 (1938).
33. *Носкова, Г. Л.:* Микробиология **16,** 449 (1947).
34. *Dubos, R. J.:* J. Exp. Med. **66,** 101 (1947).
35. *Winchester, G.* and *Murray, T. J.:* Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **35,** 165 (1936).
36. *Turner, T. B.:* J. Exp. Med. **67,** 61 (1938).
37. Topley—Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity (1947).
38. *Fuchs, L.—Pöhm, M.:* Scientia pharm. **21,** 239 (1953).
39. *Stäger, R.:* Mycol. Zbl. **1,** 198 (1912).
40. *Stuart, L. S.* and soc.: U. S. Dept. Agr. Techn. Bull. 383 (1933).
41. *Petrova, E. K.:* Arch. Microbiol. **4,** 326 (1933).
42. *Rippel—Baldes, A.:* Grundriss der Microbiologie, Berlin, 1952.
43. *Lilly, V. B.—Barnett, H. L.:* Physiology of the Fungi, New York 1951.
44. *Sternon, M. F.:* Bull. Acad. roy. Méd. Belgique **1,** 463 (1936).

ИССЛЕДОВАНИЯ ПО ПРОДОЛЖЕНИЮ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КОНИДИЙ CLAVICEPS PURPUREA (FRIES) TULASNE, ИЗОЛИРОВАННЫХ ПУТЕМ ПОГРУЖЕННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Э. Т. Глаз

Резюме

За последние годы было осуществлено искусственное заражение ржи спорами спорыньи (Claviceps purpurea) и таким образом создалась возможность получения доброкачественного растительного сырья спорыньи в производственных размерах. В связи с этим фактом возникли биологические проблемы производства и сохранимости заразного материала ржи. Выращивание конидий спорыньи для заражения ржи другие авторы осуществляли путем «стационарного» культивирования в жидких средах, на агаре или на средах, состоящих из зерен. Мы разработали метод получения заразного материала посредством погруженного культивирования (подобный технике производства антибиотиков), который описан в другой статье. Хотя этот метод очень прост и дешев и полученный заразный материал в экспериментах по заражению ржи оказался годным, однако, для заражения ржи в широких размерах длительность жизнеспособности конидий не удовлетворяла требованиям. В случаях применения других методов культивирования, жизнеспособность конидий сохраняется также только в течение нескольких месяцев, а конидии, полученные путем погруженного культивирования жизнеспособны — при комнатной температуре (25°С) и хранении в водяной взвеси — лишь в течение 8—12 дней.

Нами были испоробованы различные методы продолжения жизнеспособности конидий. Жизнеспособность определялась на основании способности конидий к прорастанию в культурах висячей капли. В процессах опытов, проводимых методом высушивания — высушивание с помощью P_2O_5, воздушной струей и под вакуумом, а также лиофилизация в присутствии коллоидов или без последних — конидии погибли. В водяной взвеси, при холодной температуре (+2—4°С), конидии сохранялись в течение 2—3 месяцев. Еще более надежным способом хранения оказалось глубокое охлаждение, при котором конидии оставались в совершенно неизменном состоянии в течение свыше полугода, от производства заразного материала до его использования. Разрешение другой части проблемы, а именно повышение сохранимости конидий при комнатной температуре или на открытом воздухе, мы достигли путем добавления к взвеси конидий сахарозы в концентрации, подобной содержанию сахара в медвяной росе (60—80%). Таким образом, конидии при температуре 25°С — вместо 8—12 дней — сохраняли жизнеспособность в течение одного месяца. Это обстоятельство осветило также вопрос, как могут быстро погибающие конидии выдерживать более высокую температуру в природе.

Согласно проведенных опытов антибиотики (стрептомицин, ауреомицин и хлоромицетин) в концентрации до 500 гамма/мл, а алкалоиды спорыньи в концентрации до 200 гамма/мл не оказывают влияния на прорастание конидий спорыньи.

Конидии спорыньи (асексуальные споры) по их сохранимости в различных условиях и по химическому составу более подобны вегетативным формам грибов чем спорам грибов, названных «conidia vera» (Vuillemin), хотя процесс их образования может быть подобен таковому последних.

Kiadásért felel az Akadémiai Kiadó igazgatója Műszaki felelős: Farkas Sándor
Kézirat beérkezett: 1955. I. 18. — Terjedelem: 10³/₄ (A/5) ív, 68 ábra (6 színes)

35247/55 — Akadémiai nyomda — Felelős vezető: ifj. Puskás Ferenc

Les Acta Microbiologica paraissent en russe, français, anglais et allemand et publient des travaux du domaine de la microbiologie.

Les Acta Microbiologica sont publiés sous forme de fascicules qui seront réunis en un volume.

On est prié d'envoyer les manuscrits destinés à la rédaction, et écrits à la machine, á l'adresse suivante :

Acta Microbiologica, Budapest, Keleti Postahivatal, Postafiók 64.

Toute correspondance avec la rédaction doit être envoyée à cette même adresse.

Le prix de l'abonnement est de 110 forints par volume.

On peut s'abonner à l'Entreprise pour le Commerce Extérieur de Livres et Journaux »Kultúra« (Budapest, VI., Sztálin út 21. Compte-courant No. 43-790-057-181) ou à l'étranger chez tous les représentants ou dépositaires.

The Acta Microbiologica publish papers on microbiological subjects in Russian, French, English and German.

The Acta Microbiclogica appear in parts of varying size, making up une volume.

Manuscripts should be typed and addressed to

Acta Microbiologica, Budapest, Keleti Postahivatal, Postafiók 64.

Correspondence with the editors should be sent to the same address.

The rate of subscription to the Acta Microbiologica is 110 forints a volume. Orders may be placed with »Kultúra« Foreign Trade Company for Books and Newspapers (Budapest, VI., Sztálin út 21. Account No. 43-790-057-181) or with representatives abroad.

Die Acta Microbiologica veröffentlichen Abhandlungen aus dem Berciche der Mikrobiologie in russischer, französischer, englischer und deutscher Sprache.

Die Acta Microbiologica erscheinen in Heften wechselnden Umfanges. Mehrere Hefte bilden einen Band.

Die zur Veröffentlichung bestimmten Manuskripte sind, mit Maschine geschrieben, an folgende Adresse zu senden :

Acta Microbiologica, Budapest, Keleti Postahivatal, Postafiók 64.

An die gleiche Anschrift ist auch jede für die Redaktion bestimmte Korrespondenz zu richten.

Abonnementspreis pro Band 110 Forint. Bestellbar bei dem Buch- und Zeitungs-Aussenhandels-Unternehmen »Kultúra« (Budapest, VI., Sztálin út 21. Bankkonto Nr. 43-790-057-50-181) oder bei seinen Auslandsvertretungen und Kommissionären.

30,— Ft

INDEX

Vas, K.: Turbidimetric Measurement of Microbial Density — *Ваш, К.:* Измерение плотности взвеси микробных клеток турбидиметрическим методом 203

Vas, K.: Kinetic Studies of the Factors Influencing Microbial Growth — *Ваш, К.:* Изучение кинетики факторов, влияющих на размножение микробных клеток 215

Vas, K. and *Proszt, G.:* Heat Destruction of Bacterial Spores in the Presence of Chemical Agents — *Ваш, К.* и *Прост, Г.:* Гибель спор бактерий под воздействием теплоты в присутствии химикатов 235

Jeney, E. und *Zsolnai, T.:* Experimentelle Angaben zur Chemotherapeutik der Bruzellose I. — *Енеи, Э.* и *Жольнаи, Т.:* Опытные данные по хемотерапии бруцеллеза I. 249

Sinkovics, J.: Untersuchungen über die Wechselwirkung nichtantibiotischer Pilze und Bakterien — *Шинкович, Й.:* Исследование взаимодействия неантибиотических грибков и бактерий 257

Klement, Z.: A New Bacterial Disease of Rice Caused by *Pseudomonas oryzicola n. sp.* — *Клемент, З.:* Новая бактериальная болезнь риса 265

Iványovics, G. and *Alföldi, L.:* Observations on Lysogenesis in B. *megaterium* and on Megacine, the Antibacterial Principle of this Bacillus Species — *Иванович, Г.* и *Альфёльди, Л.:* О лизогенезе штаммов B. Megaterium и о мегацине — антибактериальном начале этого вида бацилл 275

Serény, B.: Experimental Shigella Keratoconjunctivitis — *Шерень, Б.:* Экспериментальный кератоконъюнктивит, вызываемый дизентерийными палочками 293

Földes, J.: The Nature of Specific Polysaccharides of Tubercle Bacilli — *Фёльдеш, Й.:* О свойствах специфических полисахаридов туберкулезной палочки 297

Gláz, E. T.: Researches about the Viability and Preservation of the Conidia of *Claviceps purpurea (Fr.) Tul.*, Grown in Submerged Culture — *Глаз, Э. Т.:* Исследования по продолжению жизнеспособности конидий Claviceps Purpurea (Fries) Tulasne, изолированных путем погруженного культивирования 315

ACTA MICROBIOLOGICA

ACADEMIAE SCIENTIARUM HUNGARICAE

ADIUVANTIBUS

D. FEHÉR†, J. HORVÁTH, S. KOTLÁN, R. MANNINGER,
A. PELC, J. SZIRMAI

REDIGIT

G. IVÁNOVICS

TOMUS II FASCICULUS 4

MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA
BUDAPEST, 1955

ACTA MICROBIOL. HUNG.

ACTA MICROBIOLOGICA

A MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA MIKROBIOLÓGIAI KÖZLEMÉNYEI

KIADÓHIVATAL: BUDAPEST, V., ALKOTMÁNY UTCA 21

Az Acta Microbiologica orosz, francia, angol és német nyelven közöl értekezéseket a mikrobiológia tárgyköréből.

Az Acta Microbiologica változó terjedelmű füzetekben jelenik meg. Több füzet alkot egy kötetet.

A közlésre szánt kéziratok, géppel írva, a következő címre küldendők:

Acta Microbiologica, Budapest, Keleti Postahivatal, Postafiók 64.

Ugyanerre a címre küldendő minden szerkesztőségi levelezés.

Az Acta Microbiologica előfizetési ára kötetenként belföldre 80, külföldre 110 Ft. Megrendelhető a belföld számára az Akadémiai Kiadónál (Budapest, V., Alkotmány utca 21. Bankszámla 04-878-111-46), a külföld számára pedig a «Kultúra» Könyv és Hírlap Külkereskedelmi Vállalatnál (Budapest, VI., Sztálin út 21. Bankszámla: 43-790-057-181) vagy külföldi képviseleteinél és bizományosainál.

A következő szám ez év decemberében jelenik meg.

«Acta Microbiologica» публикует трактаты из области микробиологии на русском, французском, английском и немецком языках.

«Acta Microbiologica» выходит отдельными выпусками разного объема. Несколько выпусков составляют один том.

Предназначенные для публикации рукописи (в напечатанном на машинке виде) следует направлять по адресу:

Acta Microbiologica,
Budapest, Keleti Postahivatal, Postafiók 64.

По этому же адресу направлять всякую корреспонденцию для редакции.

Подписная цена «Acta Microbiologica» — 110 форинтов за том. Заказы принимает предприятие по внешней торговле книг и газет «Kultúra» (Budapest, VI., Sztálin út 21. Текущий счет № 43-790-057-181), или его заграничные представительства и уполномоченные.

Следующий номер выходит в декабре с. г.

DETOXIKATIONSWIRKUNG VON ULTRASCHALLWELLEN AUF DAS ENDOTOXIN DER SALMONELLA TYPHI

T. TARNÓCZY, I. JOÓ und J. SZILÁRD

Akustische Abteilung der Forschungsinstitut für Physik, und «Human» Institut für Forschung und Produktion serobakteriologischer Präparate, Budapest

(Eingegangen am 8. Mai 1954)

Bei der Erzeugung der Impfstoffe bedeutet es auch heute noch ein wichtiges und grösstenteils ungelöstes Problem, die Endotoxine derartig zu entgiften, dass sie ihre Antigen-Eigenschaft und Immunisierungsfähigkeit behalten.

Zur Entgiftung der Sh. flexneri versuchte *Goebel* [1] eine Methode mit Perjodsäure, *Barnes* [2] eine mit Wasserstoffsuperoxyd. Ihre Arbeiten bedeuten einen wesentlichen Fortschritt auf diesem Gebiete. In Ungarn verwandte *Nógrádi* [3] zur Detoxikation der Sh. flexneri das Verfahren mit Perjodsäure. Die Wirkung wird der Oxydationsfähigkeit dieser Substanzen zugeschrieben. Da auch die Ultraschallwellen eine oxydierende Wirkung ausüben [4], ergibt es sich sozusagen von selbst, dass bei der Erzeugung von Impfstoffen ebenso wie die Oxydationsmitteln, Ultraschallwellen zur Detoxikation der Endotoxine verwandbar sind.

Nach Angaben der Literatur beschäftigte man sich mit dieser Frage bis zum Beginn unserer Versuche nicht. Einzelne Detailfragen wurden jedoch untersucht. *Chambers und Weil* [5] fanden in der Suspension der mit Ultraschall zertrümmerten Pneumokokken ein Material, welches in vitro mit homologem Antipneumokokken-Serum in viel grösserer Verdünnung eine Präzipitation gab als mit einem heterologen Typ. Dagegen konnte man durch Einspritzung des Materials in Kaninchen keine Antikörperbildung verursachen. *Kasahara, Yoshida* und *Kambayashi* [6] behandelten Pertussis-Bakterien mit Ultraschall. Die Virulenz nahm ab und das Endotoxin der Bakterien ging zugrunde. In beiden Arbeiten handelt es sich um die Bestrahlung von lebenden Bakterien und die Hauptfrage war nicht die Untersuchung des Verhaltens der Endotoxine.

Kasahara und Mitarbeiter befassten sich auch mit Exotoxinen. Durch Bestrahlung von Diphtherie- [7] und Tetanus- [8] Toxin gelang es ihnen unter bestimmten Umständen die Abschwächung dieser Toxine hervorzurufen.

In der vorliegenden Arbeit untersuchen wir die Veränderungen des Endotoxins der Salmonella typhi auf Einwirkung von Ultraschallwellen. Wir wählten deshalb dieses Endotoxin, weil der «ty_2» Stamm der S. typhi, mit welchem wir auch schon früher Untersuchungen bezüglich der Ultraschallwellen durchführten [9, 10], infolge seines Gehaltes an «H», und «Vi» Antigenen zum gründlichen

Studium der Veränderungen seiner Eigenschaften sehr geeignet ist. Wir konnten damals feststellen, dass die «H» Agglutinierbarkeit durch die Steigerung der Bestrahlungsdauer wesentlich abnimmt, während gleichzeitig die «O» Agglutinierbarkeit langsam ansteigt. Wir stellten fest, dass die Wirkung des Ultraschalles auf S. typhi mechanischer Natur ist, die Verminderung der «H» Agglutination ist eine Folge des Abreissens der Geisseln. Das Serum der mit bestrahlter Suspension geimpften Kaninchen wies einen hohen «H», «O» und «Vi» Agglutinintiter auf, die Bestrahlung vernichtet also die Antigene nicht. Das Serum der mit dem sterilen Filtrat der nach Zentrifugieren filtrierten bestrahlten Suspension geimpften Kaninchen enthielt in bedeutender Menge «H», «O» und «Vi» Agglutinine, dagegen konnte man im Kontrollserum, bei geringem «H» Agglutinin das gänzliche Fehlen des «Vi» Agglutinins feststellen. Auf diese Art gelang es die Fähigkeit der Ultraschallwellen zur Freimachung der S. typhi Antigene zu beweisen.

In der vorliegenden Arbeit berichten wir über jene Versuche, in denen wir die entgiftende Wirkung des Ultraschalles auf das aus dem erwähnten S. typhi Stamm extrahierte Endotoxin untersuchten.

Material und Methodik

Angaben der Ultraschallbestrahlung. Die Bestrahlungen wurden mit Ultraschallwellen von 2. . . . 2,5 W/cm² Intensität und 835/kc/s Frequenz durchgeführt. Unser Bestrahlungsgefäss war ein mit Cellophanboden versehener Glaszylinder mit einer Oberfläche von 12,5 cm², die Kühlung wurde durch in einer Hülle strömendes Wasser gesichert. Das Material wurde ausserdem stets umgerührt. Wir bestrahlten je 50 ml Material, die Temperatur des umgerührten Materials stieg nicht über 32° C. Auf diese Art führten wir 1-, 2-, 3-, 4stündige Bestrahlungen durch.

Die Herstellungsart des Endotoxins. Das Endotoxin wurde aus dem «ty_2» Stamm nach dem Extraktionsverfahren von Boivin und Mesrobeanu [11, 12] bzw. Rauss mit Trichloressigsäure hergestellt. Die auf 2%igem Agar-Nährboden gewonnene 24stündige Kultur wurde zentrifugiert und das Gewicht des feuchten Sedimentes abgewogen. Auf 200 mg feuchte Bakterienmenge rechneten wir 1 ml n/2 Trichloressigsäure und 1 ml destilliertes Wasser. Die Suspension wurde zur Extraktion 24 Stunden lang bei +4° C aufbewahrt, dann zentrifugiert. Die obenschwimmende Flüssigkeit wurde mit einer NaOH Lösung neutralisiert, das auf diese Art gewonnene Material bildete die zu unseren Untersuchungen verwendete S. typhi Endotoxin-Lösung. Dieses Material gibt mit den bekannten Eiweissreagenzien (Biuret, Ninhydrin-Reaktion) ein negatives Ergebnis, die Mollisch-Probe fällt positiv aus. Der Stickstoffgehalt schwankt zwischen 4,7 und 5,4 mg%. Das Material ist eine hellgelbe, ein wenig opaleszierende Lösung, welche bei +4° C aufbewahrt ihre biologischen Eigenschaften Jahre hindurch unverändert behält, bei 37° C ändert sie sich mehrere Wochen hindurch nicht.

Bestimmung des Redox-Potentials und des pH-Wertes

Die Bestimmung des Redox-Potentials und der Wasserstoffionenkonzentration geschah teils mit kompensatorischen und teils mit elektronischem pH-Messer. Der pH Wert des unbehandelten Materials schwankte zwischen 7,05 und 7,35. Der höchste Wert des Redox-Potentials betrug +0,28 V, der niedrigste 0,21 V. Während der Lagerung des Materials konnte man gewisse Schwankungen beobachten.

Präzipitation. Zur Präzipitation benutzten wir «Vi», «O» und ein gemischtes «Vi» und «O» Antikörper enthaltendes Immunserum. Mit physiologischer Kochsalzlösung wurden Antigen-Verdünnungen in 0,5 ml Menge hergestellt, dazu gaben wir 0,1 ml Immunserum pro Reagenzrohr. Nachher kamen die Röhrchen auf 2 Stunden in ein 45° C-iges Wasserbad, und dann wurde das Material bis zu der am nächsten Morgen stattfindenden Ablesung auf +4° C agbekühlt.

Untersuchung der Mäusetoxizität

Wir untersuchten die Mäusetoxizität nach der Methode von Lovrekovich und Rauss [13, 14] an 15—18 g schweren, weissen Mäusen mit der Intraperitonealen Methodik. Das Endotoxin wurde normalerweise in Dosen von 0,10, 0,15, 0,20, 0,25 ml mit physiologischer Kochsalzlösung auf 0,5 ml Gesamtvolumen verdünnt eingeimpft. Zusammen mit den Kontrollversuchen wurden insgesamt 144 Mäuse geimpft, die Beobachtungsdauer betrug 48 Stunden.

Untersuchung der Immunisierungswirkung

Die zur Immunisierung verwendeten 12 Kaninchen wurden in einem Zeitraum von je 6 Tagen mit steigenden Dosen (0,1, 0,3, 0,5, 1,0, 2,0, und 4,0 ml) des Extraktmaterials intravenös geimpft. Die Blutentnahme geschah 7 Tage nach der letzten Impfung.

Ergebnisse

a) Einfluss des Ultraschalles auf pH und Redox-Potential des Endotoxins. Das pH des Endotoxins (in unbestrahltem Zustande 7,05—7,35) verschob sich je nach Dauer der Bestrahlung in die saure Richtung. Nach einer 4ständigen

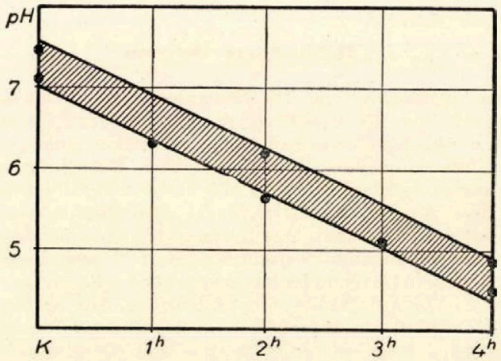


Abb. 1. Senkung der pH Werte der Materiale auf Einfluss von Ultraschallbestrahlung. Ordinate : pH, Abszisse : Bestrahlungsdauer. Die obere Linie bezieht sich auf Material No. 32, die untere auf Material No. 15

Bestrahlung sanken die pH Werte auf 4,63—4,92. Das Mass der pH-Senkung von zwei verschiedenen Endotoxinen wird in Abb. 1. demonstriert. Die starke Verschiebung in die saure Richtung ist unserer Meinung nach jener Tatsache zuzuschreiben, dass aus der organischen Chlorverbindung der Lösung auf Einfluss des Ultraschalles dünne Salzsäure entstand. Ebenso kann bei den in Anwesenheit von Luft ausgeführten Versuchen auch von dem Entstehen von Salpetersäure und salpeterigen Säure die Rede sein, wie man dies schon früher beobachtete [15].

Die Veränderung des Redox-Potentials war auf Einwirkung des Ultraschalles nicht gleichmässig. Bei dem am meisten positiven Material konnten wir + 0,28 V Spannung messen, diese sank nach einer 4stündigen Bestrahlung

um 10%. Nach der Bestrahlung zwei anderer Materialien bekamen wir die selben Endresultate (+ 0,25 V), obzwar der Ausgangswert etwas kleiner war.

b) Präzipitation. Insgesamt wurden drei Materialien auf Präzipitation untersucht. Unsere Resultate sind in Abb. 2—5 zusammengefasst. Diese Abbildungsart ermöglicht schon auf den ersten Blick einen rascheren und leichteren Vergleich, als die üblichen Tabellen.

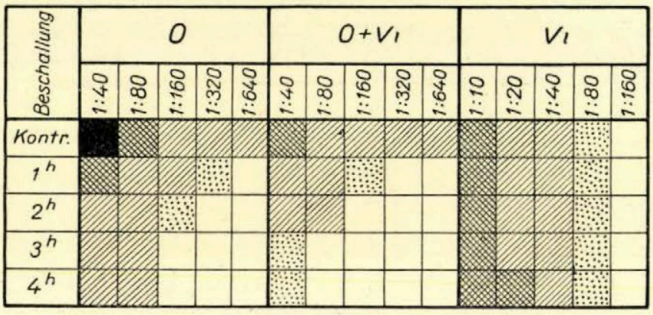


Abb. 2. Präzipitation des aus dem «ty_2» Stamm gewonnenen Endotoxins No. 15 mit «O», «O + Vi» und «Vi» Serum, bei verschiedenen Verdünnungen. Bezeichnung: schwarz ++++ und +++, schraffiert ++, liniert +, punktiert ±

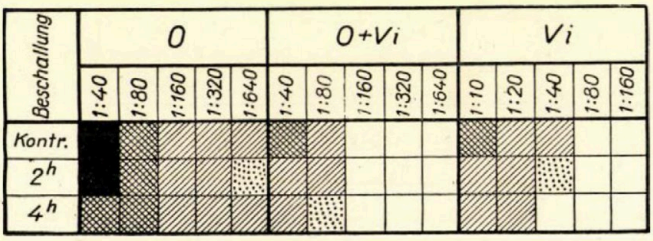


Abb. 3. Präzipitation des aus dem «ty_2» Stamm gewonnenen Endotoxins No. 32/a mit «O», «O + Vi» und «Vi» Serum bei verschiedenen Verdünnungen. Bezeichnung: s. Abb. 2

Abb. 2 fasst die Resultate der mit Material No 15 durchgeführten Untersuchungen zusammen. Der mit der Kontrolle verglichene «Vi» Präzipitationstiter blieb nach 4stündiger Bestrahlung unverändert, wobei sich der «O» und «O + Vi» Präzipitationstiter zugleich merklich verminderte. Nach längerer Bestrahlungsdauer ist die Abschwächung im allgemeinen von grösserem Ausmass.

Die Ergebnisse der mit Material No 32/*a* durchgeführten Untersuchungen gehen aus der Abb. 3 hervor. Im Gegensatz zum früheren Material fanden wir auffallenderweise keine auswertbare Präzipitationstiterveränderung. Diese Untersuchung wiederholten wir mit aus demselben Erzeugnis stammenden, aber abgesondert gelagertem Material No 32/*b* (Abb. 4) und bekamen im Wesen die selben Resultate. Zur Steigerung der oxydierenden Wirkung bestrahlten wir im Laufe dieser Messungsreihe auch eine mit Cystin gesättigte Endotoxinlösung.

Da wir auch diesmal keine Änderung feststellen konnten, wurde die 4stündige Bestrahlung weggelassen.

Zur Prüfung der zweierlei Ergebnisse, wurden die Präzipitationsuntersuchungen auch mit Material No 18 ausgeführt (Abb. 5). Diesmal wurde das Verhalten des «O + Vi» Titers nicht untersucht. Die Resultate stimmen im allgemeinen mit den bei Material No 32 gewonnenen Ergebnissen überein. So

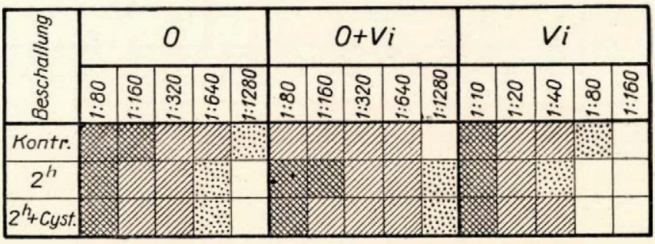


Abb. 4. Präzipitation des aus dem «ty_2» Stamm gewonnenen Endotoxins No. 32/b mit «O», «O + Vi» und «Vi» Serum bei verschiedenen Verdünnungen. Bezeichnung: s. Abb. 2

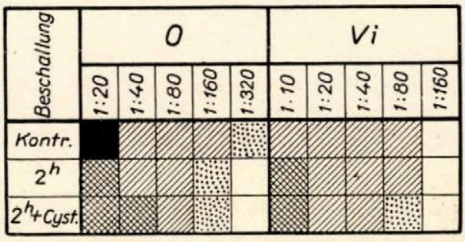


Abb. 5. Präzipitation des aus dem «ty_2» Stamm gewonnenen Endotoxins No. 18 mit «O» und «Vi» Serum bei verschiedenen Verdünnungen. Bezeichnung: s. Abb. 2

muss man eher das Verhalten des Materials No 15 als besonderes beurteilen. Als Resultat der Untersuchungen kann man feststellen, dass auf Einwirkung des Ultraschalles der «Vi» Präzipitationstiter unverändert bleibt, der «O» und der «O + Vi» Präzipitationstiter ändert sich ebenfalls nicht, eventuell vermindert er sich.

c) *Untersuchung der Mäusetoxizität.* Mit den vorher erwähnten sämtlichen Materialien wurde auch die Mäusetoxizität untersucht. Unsere Ergebnisse zeigt Tab. I. Aus der Tabelle kann man zweifellos feststellen, dass sich die Mäusetoxizität auf Einwirkung des Ultraschalles verminderte. Nach Einspritzung von 0,15 ml Material verendeten bereits alle Kontrolltiere. Von den mit bestrahltem Material geimpften Mäusen verendeten viel weniger und die Letalität erreichte erst nach Impfung mit 0,25 ml Material jene Höhe, welche schon 0,1 ml des Kontrollmaterials zustandebrachte.

Tabelle I

Mäusetoxizität des aus dem «ty_2» Stamm gewonnenen unbehandelten und mit Ultraschall bestrahlten Endotoxins

Bestrahlung	Endotoxin Menge ml	Von je 4 Mäusen kamen um						Zusammen*
		No. 15		No. 18		No. 32		
		1. Tag	2. Tag	1. Tag	2. Tag.	1. Tag	2. Tag	
Unbestrahlte Kontrolle	0,10	3	—	3	1	3	1	11/12
	0,15	4	—	1	3	4	—	12/12
	0,20	4	—	3	1	4	—	12/12
	0,25	4	—	3	—	4	—	11/12
2^h	0,10	1	—	2	—	1	—	4/12
	0,15	2	—	2	1	3	—	8/12
	0,20	1	2	3	1	3	—	10/12
	0,25	2	2	2	1	4	—	11/12
4^h **	0,10	1	—	—	—	1	—	2/12
	0,15	1	1	1	1	4	—	8/12
	0,20	2	1	2	1	3	—	9/12
	0,25	2	2	2	1	4	—	11/12

* Im Zähler die Zahl der verendeten, im Nenner die Zahl sämtlicher geimpften Mäusen.
** Material No. 18 wurde 2 Stunden lang in einer mit Cystin gesättigten Lösung, Materiale No. 15 und 32 4 Stunden hindurch in cystinfreien Substrat betsrahlt.

Als besonders günstig erwies sich das mit Cystin gesättigte, 2 Stunden hindurch bestrahlte Material, welches wir deshalb in der Tabelle mit der 4stündigen Bestrahlung in der selben Zeile schilderten.

d) *Immunisierungsuntersuchungen an Kaninchen.* Die Immunisierung der Kaninchen führten wir mit dem in grösster Menge zur Verfügung stehenden Material No 18 durch. Mit unbestrahlten, mit 2 Stunden hindurch bestrahltem reinen und mit 2 Stunden hindurch bestrahlten Cystin enthaltenden Material wurden je 4, insgesamt 12 Kaninchen geimpft. Unseren subjektiven Beobachtungen nach verursachte das unbestrahlte Material die grösste Impfungsreaktion (Appetitlosigkeit und Benommenheit), dagegen war die Reaktion der mit bestrahltem Material geimpften Tiere wesentlich schwächer. Übrigens kamen von den Kontrolltieren 2, aus der zweiten Gruppe 1, aus der dritten Gruppe 1 Tier um. In einem am Leben gebliebenen tritt aber nach der fünften Impfung halbseitige Lähmung auf.

Von den überlebenden Tieren entnahmen wir Serum zur Agglutinationsprobe. Die Resultate sind in Tab. 2 geschildert. Der «H» Agglutinationstiter des mit bestrahltem Material erzeugten Serums ist wesentlich höher, als der Titer der Kontrolle, der des mit Cystin gesättigten Materials ist noch etwas

Tabelle II

«H», «O» und «Vi» Agglutinationstiter des Kaninchenimmunserums

Serum	H					O					Vi				
	1:6400	1:12800	1:25600	1:51200	1:102400	1:6400	1:12800	1:25600	1:51200	1:102400	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160
1. Kontroll.....	++	−	−	−	−	++++	+++	++	±	−	++++	++	+	−	−
2. Kontroll.....	+++	++	−	−	−	++++	++	+	−	−	++++	++	+	±	−
1. Bestrahlt ...	++++	+++	++	±	−	+++	+	+	±	−	++	++	+	−	−
2. Bestrahlt ..	++++	+++	+++	++	±	++++	++	+	−	−	++++	++++	+++	+++	++
1. Bestrahlt ... + Cystin	++++	++++	++	++	+	++++	++++	+	±	−	++++	+++	++	+	−
2. Bestrahlt ... + Cystin	++++	++++	+++	+++	+	++++	++++	++	±	−	+++	+	±	−	−
3. Bestrahlt ... + Cystin	++++	++++	+++	++	±	++++	++++	+++	+	−	+++	++	++	+	+

höher. Der «O» Agglutinationswert weist keine wesentliche Änderung auf. Mit einer Ausnahme fanden wir auch im «Vi» Agglutinationstiter keine nennenswerte Änderung. Dies konnten wir nicht erklären, doch liegt kein Fehler der Agglutinationsprobe vor, da wir die Messung wiederholten und denselben Befund erhielten.

Aus dieser Versuchsreihe ergab es sich, dass die Immunisierungsfähigkeit auf Einwirkung des Bestrahlens nicht abnimmt, sondern im Gegenteil, eher zunimmt.

Bewertung der Resultate

Die sich aus unseren Untersuchungen ergebenden Feststellungen kann man im folgenden zusammenfassen :

Die Toxizität des Endotoxins nimmt auf Einwirkung von Ultraschall wesentlich ab. Bei unseren Untersuchumgsumständen brauchte man um eine gleiche zahl der Mäuse zu töten zwei und halbmal soviel bestrahltes Material, als vom Kontrollmaterial (Tab. I). Durch 2stündiges Bestrahlen der mit Cystin gesättigten Endotoxinlösung kann man im selben, oder noch grösserem Masse eine Toxizitätsverminderung erreichen.

Diese Beobachtung befestigt unsere Überzeugung, dass die Abnahme der Toxizität teilweise der oxydierenden Wirkung des Ultraschalles zuzuschreiben ist. Ebenfalls wird die Verminderung der Toxizität durch jenen Umstand bewiesen, dass bei den mit Ultraschall bestrahltem Endotoxin geimpften Kaninchen die Impfungsreaktion kleiner war und weniger Tiere umkamen. Letzterer Unterschied ist der kleinen Tierzahl wegen nur mit einem gewissen Vorbehalt zu bewerten.

Parallel mit der Abnahme der Toxizität konnte man auf Einwirkung des Ultraschalles das Verschieben unserer Lösungen in die saure Richtung beobachten (Abb. 1). Da in saurer Substanz die Materiale mit der Zeit zerfallen, ist es möglich, dass in der Verursachung der Entgiftung auch die säuernde Wirkung des Ultraschalles eine Rolle spielt.

Gleichzeitig, mit der starken Abnahme der Toxizität bleibt bei Behandlung mit Ultraschallwellen der «Vi» Antigengehalt und die immunisierende Wirkung der Endotoxinlösung unverändert. Den Resultaten der Präzipitationsuntersuchungen zufolge bleibt nicht nur der Wert des «Vi» Titers unverändert, sondern mit einer einzigen Ausnahme auch der Wert des «O» Titers (Abb. 2). Hinsichtich der Immunität ist das «Vi» Antigen wichtiger, so wird die Gerechtigkeit unserer obigen Feststellungen nicht durch jene bei einem von unseren Materialien gefundene bis 3 Verdünnungen beobachtete «O» Titerverminderung gefährdet. Die Präzipitation des in der Immunität eine untergeordnete Rolle spielenden «H» Antigens wurde nicht untersucht.

Die immunisirende Wirkung unserer Präparate prüften wir auch durch Impfen der Kaninchen. Der Agglutinationstiter der mit bestrahlten Materialen

erzeugten Sera änderte sich im Vergleich zu der Kontrollen nicht (Tab. II). Der «H» Agglutinationstiter bildete eine Ausnahme, da dieser um 3 Verdünnungen anstieg. Diese Tatsache kann hinsichtlich der Beurteilung der Immunisierungsfähigkeit nur vorteilhaft sein. Die Erscheinung lässt sich dadurch erklären, dass die ursprünglich eventuell zusammenhaftenden Antigen-Aggregaten durch Einwirkung des Ultraschalles wieder aufgelöst wurden wodurch ihre wirksame Oberfläche vergrössert wurde. Da sich der pH-Wert der Lösung durch das Einwirken des Ultraschalles ebenfalls veränderte, konnten die einzelnen Antigen-Elemente nicht wieder koagulieren. Die beiden anderen Antigene waren anscheinend ursprünglich nicht zur Konglomeration geneigt.

Das aus unseren Versuchen feststellbare verschiedene Verhalten der Toxizität und des Gehaltes an Antigenen lässt sich dahin deuten, dass die Toxizität des Endotoxins des S. typhi nicht die Eigenschaft der Antigene ist, sondern die eines anderen Materials, welches zusammen mit den Antigenen, eventuell irgendwie an diese gebunden — aus dem Körper der Bakterien stammt. Dieses den Ultraschall gegenüber empfindlicheres Material kann man vielleicht mit kleineren Dosen vernichten, als die widerstandsfähigeren Antigene. Diesbezügliche weitere Untersuchungen sind im Gange.

Verfasser sind *R. Backhausz* für seine wertvolle Mithilfe und Unterstützung, Frl. *S. Maron* und Frau *I. Szántó* für ihre Mitwirkung bei den Versuchen Dank schuldig.

Zusammenfassung

Es wurde die Wirkung von Ultraschallwellen auf das Endotoxin der S. typhi untersucht.

1. Auf Einfluss der Bestrahlung verminderte sich die Mäusetoxizität in jedem Fall. Das Sinken der Toxizität wurde durch zum Endotoxin gegebenes Cystin gesteigert.

2. Die chemische Wirkung der Materialien verschob sich auf Einfluss der Bestrahlung in die saure Richtung, dies ist durch Entstehung von Salzsäure zu erklären. In der Verminderung der Toxizität kann ausser der oxydierenden Wirkung des Ultraschalls auch diese Reaktion eine Rolle spielen.

3. Auf Einfluss des Ultraschalles blieb der mit Präzipitation nachweisbare Antigengehalt des Typhus-Endotoxins unverändert, in einem Falle sank der «O» Titer.

4. Die immunogene Antwort der mit bestrahltem und der mit unbestrahltem Material geimpften Kaninchen war dieselbe. Die Immunisierungsfähigkeit blieb also vollständig unversehrt.

5. Obigen Erfahrungen nach kann die Toxizität durch Ultraschallbestrahlung ohne nennenswerte Beeinflussung der Antigeneigenschaften vermindert werden. Verfasser vermuten, dass die Toxizität von der Antigen-Eigenschaft trennbar ist.

LITERATUR

1. *Goebel W. F.:* J. Exp. Med. **85,** 499 (1947).
2. *Barnes, W. F.* et soc.: J. Immunol. **56,** 256 (1947).
3. *Nógrády, Gy.:* Kísérletes Orvostudomány **5,** 25 (1953).
4. *Beuthe, H.:* Ztschr. phys. Chemie Abt. A. **163,** 161 (1933).
5. *Chambers, L. A., Weil, A. J.:* Proc. Soc. exp. Biol. & Med. **38,** 924 (1938).
6. *Kasahara, M., Yoshida, K., Kambayashi, H.:* Mnschr. Kinderh. **72,** 11 (1938).
7. *Kasahara, M., Takagi, T.:* Mnschr. Kinderh. **72,** 8 (1938).
8. *Kasahara, M., Sha-Shi-Nan, Kakusui, T.:* Mnschr. Kinderh. **78,** 97 (1939).
9. *Tarnóczy, T., Joó, I.:* Acta Physiol. Hung. **3,** 211 (1952).
10. *Joó, I.—Tarnóczy, T.:* Acta Physiol. Hung. **3,** 225 (1952).
11. *Boivin, A., Mesrobeanu, L.:* C. R. Soc. Biol. **114,** 307 (1933).
12. *Boivin, A., Mesrobeanu, L.:* Rev. d'Immun. **1,** 553 (1935).
13. *Lovrekovich, I., Rauss, K.:* Népegészségügy **21,** 14 (1940).
14. *Lovrekovich, I., Rauss, K.:* Ztschr. Immunfschg. **101,** 194 (1942).
15. *Polotzky I. G.:* J. allg. Chemie (USSR) **17,** 649 (1947).

ОБЕЗВРЕЖИВАЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ УЛЬТРАЗВУКОВ НА АНТИГЕН ТИФОЗНОЙ ПАЛОЧКИ

Т. Тарноци, И. Йоо и Я. Силард

Резюме

Авторы исследовали действие ультразвуков на эндотоксин бацилл Salmonella typhi. Облучение производили в течение 1, 2, и 4 часов ультразвуком частоты 830 kHz интенсивностью в 2—2,5 W/cm³. Пришли к следующим результатам:

1. Токсичность для мышей под действием облучения снижалась в каждом случае, понижение токсичности усиливалось при добавлении к эндотоксину цистина.

2. Под действием облучения химическое действие веществ отклоняется в сторону кислотности, что объясняется образованием соляной кислоты. В понижении токсичности кроме окисляющего действия ультразвуков может играть роль также и эта ультразвуковая реакция.

3. Под действием ультразвука содержание антигена в тифозном эндотоксине — выявляемое путем реакции преципитации — осталось без изменения. В одном случае снизился титр «О».

4. Иммунное состояние кроликов вакцинированных облученными веществами вообще было аналогично иммунному состоянию животных вакцинированных необработанными веществами. Следовательно иммунизирующая способность вполне сохранялась.

5. На основании вышеприведенных данных можно заключить, что под действием ультразвука имеется возможность снижения токсичности, не оказывая существенного влияния на антигенные свойства. Таким образом авторы предполагают, что токсичность можно отделить от антигенных свойств.

NERVENSYSTEM UND IMMUNITÄT III.

DIE WIRKUNG VON NEUROTOMIE AUF DAS ARTHUS—SACHAROW—PHÄNOMEN

Von

L. KESZTYÜS, J. SALÁNKI und M. KOLLER

Pathophysiologisches Institut der Medizinischen Universität, Debrecen

(Eingegangen am 18. September 1954)

Aus unseren früheren Untersuchungen ging eindeutig hervor, dass die Schutzhemmung des Zentralnervensystems, der Barbituratdauerschlaf, das Auftreten und die Anreicherung der spezifischen Immunkörper des Blutes ausgesprochen hemmt [1]. Nach dieser Beobachtung stellte sich selbstverständlich die Frage, auf welche Weise die Immunitätsvorgänge, d. i. die Anpassungsreaktionen des Organismus an die eiweisshaltigen Reizfaktoren durch eine teilweise Schädigung bzw. Ausschaltung des peripheren Nervensystems beeinflusst werden. Um eine Antwort auf diese Frage zu erhalten, stehen im Prinzip zwei Methoden zur Verfügung. Der eine Weg zur teilweisen Ausschaltung des peripheren Nervensystems ist die Anwendung der Lokalanästhesie, in diesem Falle müssen aber die Immunitätserscheinungen des Organismus durch akute Reaktionen indiziert werden, doch sind die akuten Immunreaktionen im allgemeinen nur zur Registrierung eines bereits vorhandenen Immunitätszustandes geeignet. Wegen der längeren Zeitdauer der Immunitätsprozesse wäre also eine serienweise, wiederholte Anwendung von lokalen Anästhetika notwendig, was mit der Gefahr des Auftretens von unerwünschten allgemeinen (zentralen) Wirkungen verbunden sein kann. Auf Grund dieser Überlegungen wurde deshalb die zweite Methode gewählt und die einzelnen Teile des peripheren Nervensystems durch Neurotomie ausgeschaltet. Zur Registrierung der Immunitätsvorgänge des Organismus wurde die Reaktion der lokalen Anaphylaxie, das *Arthus—Sacharow*-Phänomen herangezogen, einerseits deshalb, weil wir bezüglich der Ausbildung und Auswertung des *Arthus—Sacharow*-Phänomens eine entsprechende Erfahrung besassen, und andererseits, weil auf diese Weise der Zeitpunkt des Auftretens der Anaphylaxie und die Intensität der Reaktion auf dem denervierten sowie auf dem über intakte Nervenverbindungen verfügenden Hautgebiet in vivo und an demselben Tiere verglichen werden konnten, was die Feststellung der quantitativen Zusammenhänge bedeutend erleichterte.

Methodik und Versuchsergebnisse

Die Versuche wurden an 2 bis 4 kg schweren männlichen Kaninchen ausgeführt. Der erste Teil der Untersuchungen sollte vor allem die Frage klären, ob sich im Zeitpunkt des Auftretens und in der Intensität der an den beiden intakten hinteren Extremitäten zur gleichen Zeit, mit derselben Methode hervorgerufenen *Arthus—Sacharow*-Phänomene ein Unterschied feststellen lässt. Zu diesem Zwecke wurde 8 Kaninchen an beiden Hinterbeinen auf eine oberhalb des Knöchels befindliche depilierte Hautfläche von 5 bis 6 cm Durchmesser nach der Originalmethode von *Arthus* alle 4 Tage subkutan je 1 ml steriles Pferdeserum injiziert. An zwei weiteren Kaninchen wurde anstatt der *Arthus*schen Originalmethode nach dem Verfahren von *Germuth* und *Ottinger* [2] täglich intrakutan je 0,1 ml steriles Pferdeserum in den oberhalb des Knöchels befindlichen Hautbezirk der beiden hinteren Extremitäten zur Auslösung der Reaktion eingespritzt. Auf Grund von jeden Tag zweimal durchgeführten Beobachtungen wurde der Zeitpunkt des Auftretens der Phänomene und ihre Intensität festgestellt. Die diesbezüglichen Ergebnisse sind in Tabelle I wiedergegeben.

Tabelle I

Kontrolle					Mit durchschnittenem Ischiadicus				
Kaninchen Nr.	Zahl der		linke	rechte	Kaninchen Nr.	Zahl der		linke	rechte
	Tage	Injektionen	Seite			Tage	Injektionen	Seite	
71.	9	3	++	++	81.	13	4	+	++
72.	9	3	++	++	82.	13	4	+	++
73.	9	3	++	++	83.	17	5	−	++
74.	9	3	++	++	84.	17	5	−	+
75.	13	4	++	++	85.	17	5	+	++
76.	13	4	++	++	86.	17	5	+	+
77.	13	4	+	+	87.	21	6	−	++
78.	9	3	−	++	88.	21	6	−	++
79.*	8	8	++	++	89.*	12	12	−	++
80.*	12	12	++	++	90.*	12	12	++	++

− = negativ (reaktionsfrei).
\+ = Hyperämie (ohne Ödem und Nekrose).
++ = Nekrose und Ödem mit Hyperämie.
* = Sensibilisierung täglich intrakutan mit je 0,1 ml Pferdeserum.

Wie ersichtlich traten bei 9 Kaninchen von den 10 Versuchstieren an beiden hinteren Extremitäten die *Arthus—Sacharow*-Phänomene zur gleichen Zeit, mit der gleichen Intensität auf. Es stellten sich an vier Kaninchen nach der 3. Injektion (am 9. Tage) und an drei Tieren nach der 4. Injektion (am 13. Tage) an beiden Beinen Reaktionen von gleicher Intensität ein. Bei einem Kaninchen konnte an der rechten hinteren Extremität schon nach der 3. Injektion eine ausgesprochene Nekrose beobachtet werden, während gleichzeitig am linken Bein keine Reaktion zu sehen war. Bei den täglich sensibilisierten zwei Tieren traten am 8. bzw. am 12. Tage an beiden Extremitäten Ödem, Hyperämie und Nekrose auf. Laut dieser Ergebnisse erscheint also das *Arthus—Sacharow*-Phänomen an den auf gleiche Weise behandelten beiden hinteren Extremitäten im allgemeinen mit gleicher Intensität und zum gleichen Zeitpunkt.

An weiteren 10 Kaninchen wurde der N. ischiadicus der linken hinteren Extremität an der Stelle seines Austrittes in die Regio glutealis oberhalb seiner Gabelung durchschnitten und ein ungefähr 1 cm langes Nervenstück reseziert. Die Operationswunden heilten in jedem Falle *per primam*. Etwa am 14. Tage nach der Operation wurde sowohl die Extremität mit dem durchschnittenen N. ischiadicus als auch die unverletzte Extremität sensibilisiert, u. zw. in völlig gleicher Weise wie in den obigen Versuchen. Die Ergebnisse sind ebenfalls in Tabelle I zusammengestellt. Es fällt hier vor allem auf, dass die Reaktion nach der Ischiadicusdurchschneidung

auch an der *unverletzten Seite*, etwas später auftrat. An zwei Kaninchen war das *Arthus—Sacharow*-Phänomen nach der 4. Injektion (am 13. Tage), an vier Tieren nach der 5. Injektion (am 15. Tage) und an 2 Tieren erst nach der 6. Injektion (am 21. Tage) wahrzunehmen. An den nach dem Verfahren von *Germuth* und *Ottinger* täglich intrakutan sensibilisierten Tieren bildete sich die Reaktion am 12. Tage aus. Vergleicht man die unverletzte Extremität mit der ischiadicusdurchschnittenen Linken, so ist ein auffallender Unterschied in der Intensität des Effekts zu erkennen. Bei der Hälfte der Tiere blieb das ischiadicusdurchschnittene Hinterbein vollständig reaktionsfrei, während an der unverletzten Extremität in vier Fällen Nekrose und in einem Falle Hyperämie auftrat. An weiteren drei Kaninchen kam es im Gegensatz zu der an der unverletzten Seite sichtbaren Nekrose an der ischiadicusdurchschnittenen Seite nur zu Hyperämie ohne Ödem und Nekrose. Lediglich an zwei Kaninchen konnte sowohl an der unverletzten als auch an der neurotomierten Seite eine Reaktion von gleicher Intensität festgestellt werden. Aus diesen Ergebnissen geht also hervor, dass das *Arthus—Sacharow*-Phänomen nach Ischiadicusdurchschneidung im Vergleich zu den Kontrolltieren verspätet auftritt, wobei es an der denervierten Extremität auch ausbleiben kann oder von geringerer Intensität ist als an der unverletzten Extremität.

Da es bei der Durchschneidung des N. ischiadicus umstritten ist, in welchem Ausmass die Hautfläche des Hinterbeins denerviert ist — ein Teil der längs der Gefässe verlaufenden Nervenfasern bleibt nämlich intakt —, ging das Bestreben in den nächsten Versuchen dahin, auf einem gewissen Hautgebiet auch die periarteriellen Nervengeflechte zu durchtrennen. Zu diesem Zwecke wurde die von *Mansfeld* vorgeschlagene Methode [3] angewandt, deren Wesen darin besteht, dass man an der einen Seite des Kaninchenrückens unter sterilen Verhältnissen in zwei Phasen einen kreisförmigen Lappen ausschneidet, u. zw. dermassen, dass man zuerst einen halbkreisförmigen Schnitt macht und die Haut auf dem so umgrenzten Gebiet vollständig aufpräpariert und dann zurücknäht. Nach 10 Tagen, wenn die Stelle der vorherigen Operation völlig geheilt und die Blutversorgung des Lappens an dieser Seite gesichert ist, macht man aus dem vorigen Halbkreis einen ganzen Kreis und präpariert die Haut nunmehr auf der Fläche des neuen Halbkreises von ihrer Basis ab. Darauf wird der Lappen zurückgenäht. Nach 7 bis 8 Tagen ist auch die Wunde der zweiten Operation völlig geheilt. Laut Befund der histologischen Kontrolluntersuchungen wachsen die durchschnittenen Blutgefässe rasch in die verletzten Gewebe hinein, während zur Regeneration der Nerven eine längere Zeitspanne, mehrere Monate notwendig sind.

Bei insgesamt 8 auf solche Weise operierten Kaninchen wurde das *Arthus—Sacharown* Phänomen sowohl an der denervierten als auch an der intakten symmetrischen Stelle der anderen Rückenseite hervorgerufen. Die Ergebnisse sind in Tabelle II zusammengefasst.

Tabelle II

Kaninchen Nr.	Zahl der		Denervierter Hautlappen	Kontrolle (intakte symmetrische Hautfläche)
	Tage	Injektionen		
91.	13	4	−	++
92.	13	4	+	++
93.	13	4	+	++
94.	17	5	−	++
95.	17	5	−	+
96.	21	6	−	++
97.	21	6	+	++
98.	21	6	−	++

− = negativ (reaktionsfrei).
\+ = Hyperämie (ohne Ödem und Nekrose).
++ = Nekrose mit Ödem und Hyperämie

Wie ersichtlich ergab sich auf der denervierten Fläche entweder eine mildere Reaktion oder blieb das Phänomen überhaupt vollständig aus (3—5 Fälle).

Diskussion

Nach den hier vorgeführten Ergebnissen hemmt die teilweise oder vollständige Ausschaltung des peripheren Nervensystems ausgesprochen das durch die Reaktion der an Gewebszellen adsorbierten spezifischen Antikörper mit dem Antigen hervorgerufene *Arthus—Sacharow*-Phänomen. Diese Feststellung steht mit den Angaben von *Buchwald* [4] und von *Wyropajew* [5] im Einklang, laut derer nach Ausschaltung der sensiblen und motorischen Nerven des peripheren Systems eine hyperergische Entzündung entweder überhaupt nicht oder nur in wesentlich schwächerer Form ausgelöst werden kann. Unsere Ergebnisse werden auch durch die Beobachtung von *Naegeli* [6] gestützt, wonach die *Pirquet*sche Probe negativ wird, wenn man die Haut mit Novocain infiltriert. Demgegenüber gelangte *Klinge* [7] zu einem gegensätzlichen Resultat: er vermochte am Ohr von sensibilisierten Kaninchen selbst nach Durchtrennung des N. auricularis und des Halssympathicus eine hyperergische Entzündung auszulösen. Dem kann jedoch entgegengehalten werden, dass das Kaninchenohr ein wenig geeignetes Objekt zur Untersuchung dieser Frage darstellt, da es nur sehr schwer denerviert werden kann, weil es ausser dem Sympathicus auch vom N. facialis, N. trigeminus und N. vagus Fasern bekommt. Übrigens hat am Kaninchenohr die hyperergische Entzündung bloss ein Ödem zur Folge, eine Nekrose pflegt nicht aufzutreten [8].

Die Schädigung der normalen, intakten Nervenverbindungen hemmt also zweifellos das Auftreten der anaphylaktischen Hautreaktion. Äusserst schwierig lässt sich dagegen die Frage beantworten, auf welche Weise die Ausschaltung bzw. Verletzung des peripheren Nervensystems den Pathomechanismus beeinflusst. Aus dem Umstand, dass die Reaktion auf der denervierten Seite in einzelnen Fällen ausbleibt bzw. nur in verminderter Intensität erscheint, lässt sich die Folgerung ziehen, dass das Nervensystem in den sich nach der Reinjektion abspielenden Prozessen eine massgebende Rolle spielt. Es erscheint als wahrscheinlich, dass die Reaktionsfähigkeit der ihrer nervösen Verbindungen beraubten Haut vermindert ist. Daneben kann aber auch die Annahme nicht völlig von der Hand gewiesen werden, dass in der denervierten Haut die Konzentration an anaphylaktischen Antikörpern oder Antigen geringer ist, doch ist es auch möglich, dass das Zusammentreffen des Antigens mit homologen Antikörpern und infolgedessen der Ablauf der Antigen-Antikörper-Reaktion in der denervierten Haut gestört wird.

Es ist ferner hervorzuheben, dass das *Arthus—Sacharow*-Phänomen auch an der unverletzten Seite der ischiadicusdurchschnittenen Kaninchen im Vergleich zu den nicht operierten normalen Kontrollen verspätet auftrat, so dass die Möglichkeit besteht, dass die grobe Schädigung des peripheren Nervensystems auch die Immunstoffproduktion selbst beeinflusst. Eine eingehendere Untersuchung all dieser Möglichkeiten wird die Aufgabe unserer weiteren Versuche sein.

Zusammenfassung

An den ischiadicusdurchschnittenen hinteren Extremitäten, sowie an denervierten Hautlappen von Kaninchen bleibt das *Arthus—Sacharow*-Phänomen entweder vollständig aus, oder tritt schwächer auf als an der über intakte Nervenverbindungen verfügenden Kontrollseite. Auch an den innervierten, intakten Extremitäten der operierten Tiere erfolgt die Reaktion erst nach einer längeren Zeit und nach stärkerer Sensibilisierung. Die Intaktheit des peripheren Nervensystems fördert also die Entstehung des *Arthus—Sacharow*-Phänomens, während seine Schädigung das Auftreten des Phänomens ausgesprochen hemmt.

LITERATUR

1. *Kesztyüs, L., Szilágyi, T.* und *Gyulai, F.:* Acta Microbiol. Hung. **1,** 359 (1954).
2. *Germuth, F. G.* und *Ottinger, B.:* Proc. Soc. exp. Biol. & Med. **74,** 815 (1950).
3. *Mansfeld, F.:* Orvosok Lapja **4,** 321 (1948).
4. *Buchwald, H.:* Med. Klin. **36,** 1302 (1940).
5. *Wyropajew* zit. nach *Urbach* und *Gottlieb:* Allergy. New York. 1949.
6. *Naegeli, H.:* Zbl. Chirurg. **46,** 22 (1919).
7. *Klinge, F.:* Klin. Wschr. 1927. 2265.
8. *Lasowsky, J. M.* und *Kogan, M. M.:* Virch. Arch. **229,** 428 (1934).

НЕРВНАЯ СИСТЕМА И ИММУНИТЕТ III.

Влияние невротомии на феномен Артюса—Сахарова

Л. Кестьюш, Я. Шаланки и *М. Коллер*

Резюме

На задней конечности с перерезанным седалищным нервом, а также на денервированном кожном лоскуте кроликов — по сравнению с контрольной стороной, обладающей неповрежденными нервными соединениями — Феномен Артюса—Сахарова или появляется в более легкой форме, или же совсем отсутствует. У оперированных животных, также и на имеющей неповрежденные нервные соединения конечности, спустя более продолжительное, время и после более сильной сенсибилизации наступает реакция. Следовательно неповрежденность нервной системы способствует развитию реакции Артюса—Сахарова, а поврежденность явно тормозит таковую.

NERVENSYSTEM UND IMMUNITÄT IV.

DIE WIRKUNG VON NEUROTOMIE UND NARKOSE AUF DAS SHWARTZMAN-PHÄNOMEN

Von

L. KESZTYÜS, H. CSERNYÁNSZKY, M. KOLLER und J. SALÁNKI

Pathophysiologisches Institut der Medizinischen Universität, Debrecen

(Eingegangen am 18. September 1954)

Laut unserer vorhergehenden Untersuchungen [1] hemmt partielle Schädigung des peripheren Nervensystems ausgesprochen die Ausbildung der lokalen anaphylaktischen Reaktion, des *Arthus—Sacharow*-Phänomens. Da mehrere Forscher annehmen, dass das in seinem Pathomechanismus vorläufig ziemlich ungeklärte *Shwartzman*-Phänomen (hämorrhagische Heteroallergie) eine mit der Anaphylaxie identische oder ihr ausserordentlich nahestehende Reaktionsform darstellt, schien es von Interesse, die Rolle zu untersuchen, die das Nervensystem bei der Entstehung des *Shwartzman*-Phänomens spielt.

Über eine solche Rolle des Nervensystems finden sich in der Literatur nur verhältnismässig wenige und dabei einander widersprechende Angaben. *Tusch* und *Moser* [2] führten an Kaninchen nach der Methode von *Sanarelli* Untersuchungen durch, wobei sie zu dem Ergebnis gelangten, dass die Intaktheit des Nervensystems die grundlegende Vorbedingung für die Wirksamkeit der sensibilisierenden Injektion darstellt, dass aber die nach der auslösenden Injektion eintretende nekrotische Reaktion bereits unabhängig vom Nervensystem abläuft. Sie beobachteten nämlich, dass das *Sanarelli*-Phänomen nach Halsmarkdurchtrennung in der Höhe des 6. Halswirbels 1 Stunde vor der intraperitonealen Verabreichung der sensibilisierenden Typhus- bzw. Cholerakultur nicht ausgelöst werden kann, während derselbe Eingriff nach der sensibilisierenden Injektion den Reaktionsablauf nicht mehr verändert. *Kolpakow* [3] untersuchte dagegen das *Shwartzman*-Phänomen. Er trennte in seinen Versuchen die hinteren Extremitäten von Kaninchen so vom Rumpfe, dass nur die Arterien und Venen die Verbindung aufrechterhielten. An der auf diese Weise denervierten Extremität löste er das *Shwartzman*-Phänomen durch Colifiltrat aus, wobei das andere, unverletzte Hinterbein als Kontrolle diente. Die Reaktion trat auch an der denervierten Extremität auf und war manchmal sogar intensiver als an der intakten. Im Endergebnis fördert also die Intaktheit des peripheren Nervensystems nach *Kolpakow* keinesfalls das Auftreten des *Shwartzman*-Phänomens, sondern wirkt sich eher hemmend aus.

Methodik und Versuchsergebnisse

In Vorversuchen sollte zuerst der Unterschied festgestellt werden, der sich in der Intensität des zur gleichen Zeit ausgelösten *Shwartzman*-Phänomens an den beiden intakten hinteren Extremitäten von Kaninchen zeigt. Zu diesem Zwecke wurde ein Hautbezirk von einem Durchmesser von 5 bis 6 cm an beiden hinteren Extremitäten von 2 bis 4 kg schweren normalen Kaninchen oberhalb des Knöchels depiliert. In diese Stelle wurde sensibilisierend 0,25 ml steriles Filtrat einer 48stündigen Bouillonkultur von standardisierten, polyvalenten E. coli-Stämmen (Antigenstruktur $111B_4$, $055B_5$ und $026B_6$) intrakutan injiziert. Nach 24 Stunden wurden 2 ml/kg Körpergewicht desselben Filtrats intravenös verabreicht. 4 Stunden nach der Zweitinjektion wurde der vom hyperämischen Gebiet umgebene schwarze, scharf abgegrenzte nekrotische Fleck auf Zellophanpapier kopiert und seine Ausdehnung mit Hilfe eines Planimeters bestimmt. Die Grösse der an der rechten Extremität festgestellten nekrotischen Fläche wurde mit der nekrotischen Fläche am linken Hinterbein verglichen und der Unterschied in mm^2 und % in Tabelle I eingetragen.

Tabelle I

Shwartzman-Phänomen an Kontrollkaninchen

Kaninchen Nr.	Hämorrhagische Fläche in mm^2		Abweichung	
	links	rechts	mm^2	%
99.	75	94	−19	−20
100.	189	144	+45	+31
101.	458	484	—26	— 5
102.	114	99	+15	+15
103.	160	125	+35	+28
104.	158	238	−80	−34
105.	—	47	−47	−100

Wie aus den Angaben der Tabelle ersichtlich, besteht zwischen der Ausdehnung der an symmetrischen Stellen der beiden hinteren Extremitäten zur gleichen Zeit und mit der gleichen Methode hervorgerufenen *Shwartzman*-Nekrose — von einem schlecht reagierenden Kaninchen abgesehen — ein Unterschied von weniger als 100 mm^2, was einer Streuung von etwa $\pm 35\%$ entspricht.

In unseren weiteren Versuchen wurde bei 6 Kaninchen der N. ischiadicus der hinteren linken Extremität an der Stelle des Austrittes in die Regio glutealis, oberhalb seiner Gabelung durchschnitten und ein ungefähr 1 cm langes Nervenstück reseziert. Die Operationswunde heilte in jedem Falle *per primam*. 25 bis 32 Tage nach der Operation wurde sowohl am unverletzten als auch am ischiadicusdurchschnittenen Hinterbein mit der gleichen Technik wie in den Vorversuchen das *Shwartzman*-Phänomen hervorgerufen und ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Tabelle II zusammengefasst.

Wie aus den Angaben der Tabelle deutlich hervorgeht, zeigte die Ausdehnung des nekrotischen Gebietes an den unverletzten und denervierten hinteren Extremitäten der 6 Tiere mit durchtrenntem N. ischiadicus eine grössere Streuung als in den Vorversuchen, wobei aber die Unterschiede nicht die gleiche Richtung aufwiesen. In einem Falle wurde nämlich auf der Kontrollseite in 4 Fällen an der ischiadicusdurchschnittenen Extremität eine ausgedehntere Reaktion festgestellt und in einem Falle hatten die Reaktionen eine gleich grosse Ausdehnung.

Bei weiteren 6 Kaninchen wurde auf der einen Seite des Rückens nach der von *Mansfeld* vorgeschlagenen Methode [4] ein Hautbezirk von 6 bis 7 cm Durchmesser denerviert. Als Kontrolle diente eine symmetrisch gelegene gleich grosse unverletzte Hautstelle an der anderen Seite des Rückens. An beiden Stellen wurde zum gleichen Zeitpunkt (10 bis 30 Tage nach der zweiten Operation) mit ähnlicher Technik wie in den vorhergehenden Versuchen das *Shwartzman*-Phänomen hervorgerufen. Die Reaktion trat sowohl auf der unverletzten als auch auf der denervierten Hautstelle zur gleichen Zeit auf. Die diesbezüglichen Ergebnisse sind in Tabelle III zusammengefasst.

Tabelle II

Shwartzman-Phänomen an Kaninchen mit durchschnittenem N. ischiadicus

Kaninchen Nr.	Hämorrhagische Fläche in mm² auf der hinteren Extremität		Abweichung	
	mit durchschnittenem N. ischiadicus	Kontrolle	mm²	%
106.	238	355	−117	− 33
107.	608	572	+ 36	+ 6
108.	457	378	+ 79	+ 21
109.	572	158	+414	+262
110.	47	−	+ 47	−
111.	23	25	− 2	− 8

Tabelle III

Shwartzman-Phänomen an denervierten Hautlappen

Kaninchen Nr.	Hämorrhagische Fläche in mm²		Abweichung	
	Denervierte Seite	Kontroll-Seite	mm²	%
112.	118	138	− 20	− 14
113.	225	227	− 2	− 1
114.	252	50	+202	+404
115.	56	248	−192	− 77
116.	158	36	+122	+340
117.	79	18	+ 61	+340

Wie ersichtlich, wies die Reaktion bei einem Tier auf beiden Rückenseiten ungefähr die gleiche Ausdehnung auf, in 3 Fällen war die Nekrose auf den denervierten Hautlappen, in 2 Fällen auf den als Kontrolle dienenden intakten Hautstellen grösser.

Auf Grund der ausgeführten Versuche ergab sich also, dass eine partielle Schädigung des peripheren Nervensystems die Intensität des *Shwartzman*-Phänomens nur unauswertbar beeinflusste.

Nach diesen Versuchsergebnissen wirkte die neueste Beobachtung von *Sdrodowski* [5] bis zu einem gewissen Grade überraschend, wonach der durch Pharmaka hervorgerufene Schlaf die Kaninchen vollständig vor dem Auftreten des *Shwartzman*-Phänomens schützt. Zur gleichen Zeit, aber unabhängig von *Sdrodowski* beschrieben *Nasta* und *Negelescu* [6] ebenfalls das Ausbleiben des *Shwartzman*-Phänomens in Narkose. Auf Grund dieser Beobachtungen schien es angezeigt, die Wirkung des durch Pharmaka hervorgerufenen Schlafes auf die Entstehung des *Shwartzman*-Phänomens näher zu untersuchen.

Vor Beginn dieser neueren Versuche stellte sich zuerst die Frage nach der Möglichkeit einer annähernd exakten und quantitativen Methode zur Auswertung der Intensität des an verschiedenen Tieren hervorgerufenen *Shwartzman*-Phänomens. In den bisherigen Versuchen wurde nämlich die Grösse der nekrotischen Flächen des *Shwartzman*-Phänomens miteinander verglichen, das stets an ein und demselben Tier auf der unverletzten und auf der denervierten Haut-

stelle zur gleichen Zeit hervorgerufen wurde. Auf diese Weise erhielt man an jedem Tier zugleich auch die als Vergleichsgrundlage dienende Kontrollangabe, wodurch der Effekt der Schädigung des peripheren Nervensystems — unseres Erachtens — ziemlich exakt beurteilt werden konnte. Die Schlafversuche lassen sich jedoch mit einer solchen Selbstkontrolltechnik natürlich nicht ausführen. Übrigens konnte auch in den Vorversuchen beobachtet werden, dass selbst an ein und demselben Tier die Streuung recht gross war (es kamen Abweichungen von $\pm 35\%$ vor), so dass es beim Vergleich der verschiedenen Versuchstiere infolge der erheblichen Ausdehnung der Fehlergrenze nicht möglich ist, zu auswertbaren Ergebnissen zu gelangen.

Auf Grund dieser Überlegung wurde eine neue Versuchsmethodik zur annähernden quantitativen Bestimmung der Intensität des *Shwartzman*-Phänomens ausgearbeitet. Ähnlich wie bei der *Jensen*schen Titrierung des Diphtherietoxins [7] wurde die depilierte Rückenhaut von Kaninchen in 6 ungefähr 15 bis 20 cm^2 grosse Flächen eingeteilt und dann als sensibilisierende

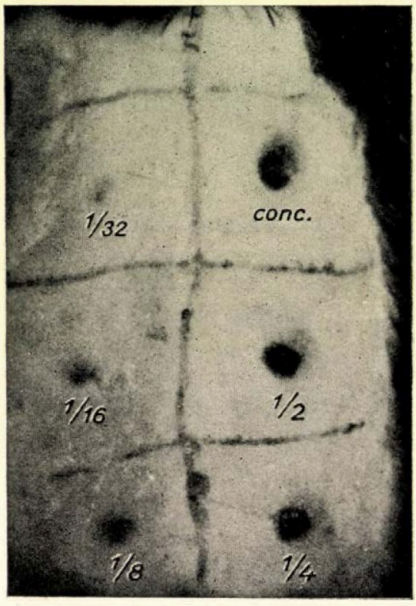


Abb. 1. Quantitatives Shwartzman-Phänomen

Behandlung in die einzelnen Flächen je 0,1 ml Dyspepsiecoli-Filtrat von verschiedener Konzentration (von konzentriert bis 1 : 32) intrakutan eingespritzt. Nach 24 Stunden erfolgte dann die Auslösung der Reaktion durch die intravenöse Zweitinjektion von 2 ml/kg Körpergewicht konzentriertem Filtrat. Die Stärke der Reaktion wurde 4 Stunden nach der auslösenden Injektion bestimmt. Das hervorgerufene *Shwartzman*-Phänomen ist in Abb. 1 zu sehen.

In der Abbildung ist der nekrotische Fleck deutlich erkennbar, der an den Stellen der sensibilisierenden Injektionen mit konzentriertem Filtrat bzw. mit Filtraten von einer Verdünnung von 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8, 1 : 16 und 1 : 32 entstanden war. Weniger gut ist dagegen das hyperämische Gebiet wahrzunehmen, das die nekrotischen Flecke umgibt. Sowohl die hyperämischen als auch die nekrotischen Gebiete wurden auf Zellophanpapier kopiert und ihre Fläche mit Hilfe eines Planimeters bestimmt und sodann die Grösse der an den einzelnen Tieren festgestellten hämorrhagischen bzw. hyperämischen Gebiete summiert. Gleichzeitig wurde auch die grösste Verdünnung festgestellt, bei der das als Erstinjektion verabreichte Coli-Filtrat noch eine hämorrhagische Nekrose auslöste.

Das quantitative *Shwartzman*-Phänomen wurde an insgesamt 28 Kaninchen hervorgerufen. Von diesen erhielten 9 Tiere während des *Shwartzman*-Versuches keinerlei andere Behandlung ; 8 Tiere wurden 2 Stunden vor der sensibilisierenden Injektion mit 0,1 g/kg Körpergewicht Sevenal intraperitoneal narkotisiert, wobei die Sevenalbehandlung nach 24 Stunden (2 Stunden vor der auslösenden Injektion) wiederholt wurde ; 5 Kaninchen wurden nur am Tage

der sensibilisierenden und 6 Kaninchen nur am Tage der auslösenden Injektion narkotisiert. Die in den verschiedenen Gruppen erhaltenen Durchschnittswerte sind in Abb. 2 dargestellt.

Wie aus der Abbildung gut ersichtlich ist, wird die Ausbildung der Nekrose nicht durch den Umstand beeinflusst, dass die sensibilisierende Injektion in Narkose gegeben wurde, da die Grösse der nekrotischen Fläche mit der der Kontrolltiere übereinstimmt. Wurde dagegen die auslösende Injektion in Narkose verabreicht, so wird die Ausdehnung der nekrotischen Reaktion geringer; die nekrotische Reaktion ist dann am schwächsten, wenn sowohl die Sensibilisierung als auch die Auslösung in Narkose erfolgt waren. Im wesentlichen lässt sich dasselbe auch aus dem Diagramm feststellen, das den Durchschnitt der grössten noch Nekrose verursachenden Verdünnungen, d. i. den Titer veranschaulicht. Bei Sensibilisierung in Narkose ist der Titer dem der nicht behandelten Kontrolltiere gleich; bei in Narkose angewandter Zweitinjektion trat Nekrose nur an jenen Injektionstellen auf, wo die Erstinjektion mit konzentrierten Filtraten durchgeführt worden war; am niedrigsten war der Titer ebenfalls bei den zweimal sevenalbehandelten Tieren. Die Intensität der Hyperämie wurde dagegen von den zweimaligen Schlafbehandlungen

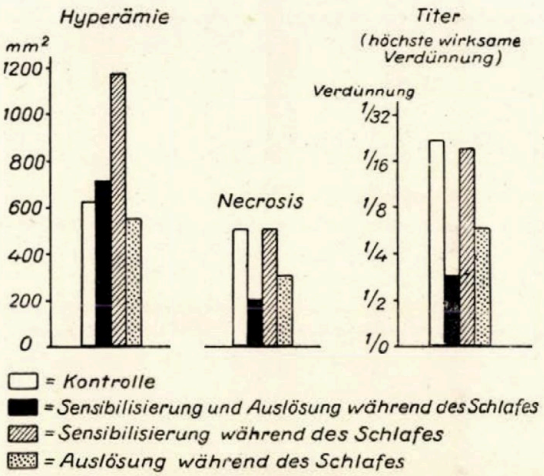


Abb. 2

bzw. von dem Umstand, dass die Tiere die Zweitinjektion in Narkose erhielten, nicht beeinflusst, während sich nach im Sevenalschlafe verabreichter sensibilisierender Injektion die Ausdehnung der hyperämischen Reaktion beträchtlich erhöhte.

Da nach der Auffassung von *Stetson* [8] bei der Entstehung des *Shwartzman*-Phänomens der Leukopenie, die kurz nach der intravenösen auslösenden Injektion im peripheren Blut auftritt, eine primäre Rolle zukommt, so dass an der Stelle der Erstinjektion durch die gesteigerte Zusammenballung der Leukozyten entstandene Thromben nachgewiesen werden können, wurde sämtlichen 28 zum quantitativen *Shwartzman*-Versuch herangezogenen Tieren vor der Auslösung und 4 Stunden nach der Auslösung Blut entnommen. In beiden Proben wurden dann die Zahl der roten und weissen Blutkörperchen, das Gesamteiweiss und mit Hilfe der Papierelektrophorese auch die einzelnen Serumeiweissfraktionen bestimmt. Die Durchschnittsergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abb. 3 zusammengefasst.

Wie aus den Diagrammen ersichtlich, hatten sich bei den Kontrolltieren die Durchschnittswerte der Anzahl der roten Blutkörperchen und des Gesamteiweissgehaltes im Laufe der Ausbildung des *Shwartzman*-Phänomens erhöht, der statistischen Auswertung zufolge sind aber diese Erhöhungen nicht als bedeutend zu betrachten. Auch bei den Werten der einzelnen Serumeiweissfraktionen konnten keine bedeutenden, auswertbaren Veränderungen festgestellt werden. Demgegenüber trat die Abnahme der Zahl der weissen Blutzellen konsequent und ausgeprägt bei jedem Kontrollversuch auf und erwies sich auch statistisch als signifikant. Bei den narkotisierten Kaninchen blieb dagegen diese bei jedem Kontrollversuch beobachtete Leukopenie vollständig aus.

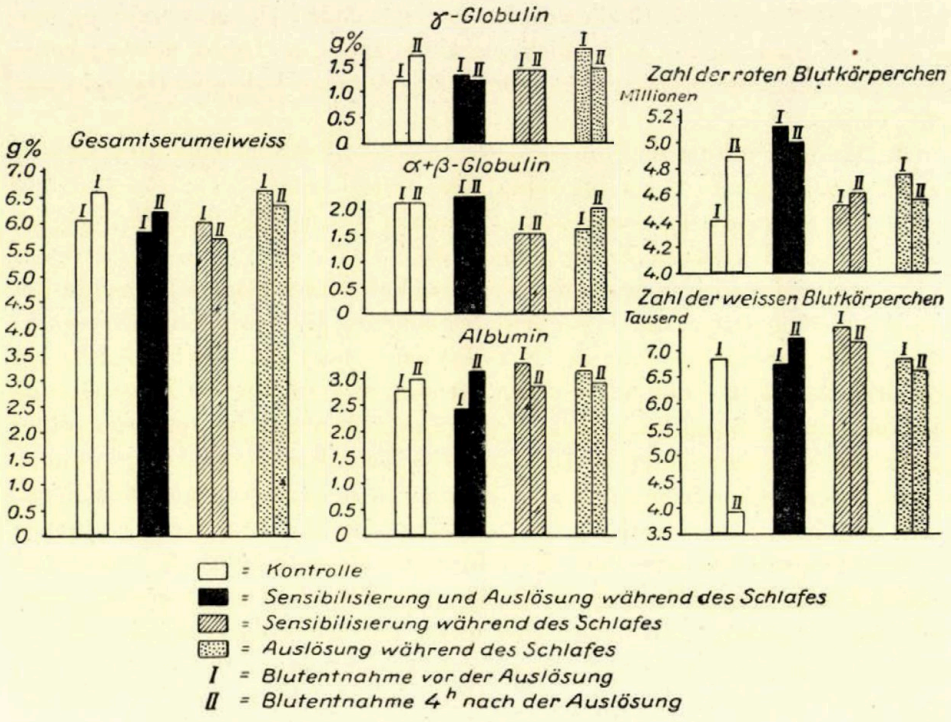


Abb. 3

Diskussion

Der Pathomechanismus des *Shwartzman*-Phänomens ist ein bisher noch nicht geklärtes Problem. Es hatte den Namen »hämorrhagische Heteroallergie« vor allem deshalb erhalten, weil es — ähnlich wie bei Anaphylaxie — auch hier eine sensibilisierende und eine auslösende Injektion gibt, ferner deshalb, weil bei jenen Tierarten (Mäusen, Ratten), an denen die anaphylaktischen Erscheinungen schwer hervorgerufen werden können, auch das *Shwartzman*-Phänomen nur schwer auszulösen ist. Zahlreiche Beobachtungen bezeugen jedoch, dass zwischen den anaphylaktischen Erscheinungen und dem *Shwartzman*-Phänomen wesentliche Unterschiede bestehen. Von den diesbezüglichen Feststellungen seien hier die wichtigsten angeführt :

1. Das zur sensibilisierenden und das zur auslösenden Injektion verwendete Impfgut kann von unterschiedlicher chemischer Zusammensetzung sein, wobei das letztere keine Antigeneigenschaften besitzen muss.

2. Die Inkubationszeit zwischen den sensibilisierenden und auslösenden Injektionen ist sehr kurz, sie beläuft sich auf bloss 12 bis 24 Stunden. Nach etwa 120 Stunden kann das Phänomen überhaupt nicht mehr hervorgerufen werden.

3. Beim *Shwartzman*-Phänomen ist eine spezifische Desensibilisierung und eine passive Übertragung unmöglich, es kann auch an Tieren hervorgerufen werden, die einen anaphylaktischen Schock überstanden haben (antianaphylaktische Tiere).

4. Das Material der sensibilisierenden Injektion kann niemals — im Gegensatz zur Anaphylaxie — ein tierischer Eiweissstoff sein.

5. Die Nekrose beim *Shwartzman*-Phänomen weicht auch pathohistologisch von den anaphylaktischen Erscheinungen ab.

Laut des eindeutigen Ergebnisses unserer Versuche wurde die Intensität des *Shwartzman*-Phänomens durch partielle Schädigung des peripheren Nervensystems — bei Durchschneidung des N. ischiadicus durch die Durchtrennung der peripheren sensiblen und motorischen Nerven bzw. durch die Denervierung der Haut — nicht beeinflusst. Diese Ergebnisse stehen mit der auf Grund einer anderen Methode gemachten Feststellung von *Kolpakow* im Einklang, wonach das *Shwartzman*-Phänomen auch an Gliedmassen hervorgerufen werden kann, die mit dem Körper nur durch die Gefässe verbunden sind. In unseren Versuchen liess sich dagegen keine intensivere Ausbildung des Phänomens auf der denervierten Seite beobachten. Allerdings hatte dies auch *Kolpakow* nur in einigen wenigen Fällen festgestellt. Auf Grund aller dieser Tatsachen darf hier die Schlussfolgerung ausgesprochen werden, dass die Durchschneidung des N. ischiadicus bzw. die Denervierung des *Shwartzman*-Phänomen nicht beeinflusst, weil die Reaktion auf dem teilweise oder vollständig denervierten Hautbezirk sowie auf der symmetrischen, über intakte Nervenverbindungen verfügenden Hautfläche in gleich grosser Ausdehnung auftritt.

Es muss hier betont werden, dass in unseren vorhergehenden Versuchen [1] die mit einer ähnlichen Methodik verursachte Schädigung des peripheren Nervensystems die Ausbildung der lokalen anaphylaktischen Reaktion, des *Arthus—Sacharow*-Phänomens, ausgesprochen gehemmt hat. So kann denn bei Vergleich der im Zusammenhang mit dem *Arthus—Sacharow*- und dem *Shwartzman*-Phänomen gemachten Erfahrungen festgestellt werden, dass zwischen diesen beiden Phänomenen ein grosser Unterschied bezüglich der Rolle des Nervensystems besteht. Auf Grund des hier nachgewiesenen Unterschiedes sowie der weiteren oben aufgezählten 5 Feststellungen darf behauptet werden, dass *der Pathomechanismus der Anaphylaxie und des Shwartzman-Phänomens grundsätzlich voneinander abweichen*, und dass der auf eine Verwandtschaft oder Identität hinweisende Terminus technicus »hämorrhagische Heteroallergie« nur stört, und dass statt seiner — da er ja nicht zutrifft — die Anwendung des Ausdruckes »*Shwartzman*-Phänomen« zu empfehlen ist.

Die partielle Schädigung des peripheren Nervensystems ist also auf den Ablauf des *Shwartzman*-Phänomens ohne Einfluss, doch liess sich auf Grund unserer weiteren Versuche zweifellos feststellen, dass ein vor der Provokation durch Pharmaka ausgelöster Schlaf den *Shwartzman*-Effekt hemmt. Die Hemmwirkung

ist etwas stärker, wenn sowohl die präparative als auch die provokative Injektion an narkotisierten Tieren erfolgt. Demgegenüber übt die nur vor der intradermalen Erstinjektion angewandte Sevenalbehandlung (in welchem Falle sich das Tier bei der Auslösung nicht mehr in Narkose befindet) keinen Einfluss auf die Entstehung des *Shwartzman*-Phänomens aus.

Laut unserer Ergebnisse ist die Hemmwirkung des Sevenalnarkose kein absoluter Massstab, weil sie 1. sich nur auf die hämorrhagische nekrotische Hauterscheinung bezieht, während sie auf die Entstehung der Hyperämie keine Wirkung ausübt, und 2. auch von der Menge des zur sensibilisierenden Injektion benutzten Endotoxins abhängt, da bei Anwendung von grösseren Endotoxinmengen die Nekrose, wenngleich in geringerer Ausdehnung, aber dennoch auftritt. Die auf eine absolute Hemmung hinweisenden Beobachtungen von *Sdrodowski* bzw. *Nasta* und *Negelescu* lassen sich dahin erklären, dass sie bei ihren Versuchen die Tiere intradermal mit einer dem Titer nahestehenden Endotoxinmenge sensibilisierten und dass sie deswegen infolge der Wirkung der Narkose einen vollständigen Schutzeffekt feststellten. Für ähnlich gerichtete Versuche ist daher im Interesse einer exakteren Auswertung die von uns ausgearbeitete quantitative *Shwartzman*-Reaktion als Methode zu empfehlen.

Eine partielle Schädigung des peripheren Nervensystems beeinflusst also das *Shwartzman*-Phänomen nicht, während es von der durch Schlafmittel hervorgerufenen Schutzhemmung des Zentralnervensystems relativ gehemmt wird. Die Erklärung für diese Erscheinung liegt vermutlich darin, dass der Einfluss des Zentralnervensystems auf der sensibilisierten Haut nicht über die peripheren Nerven, sondern auf hormonal-humoralem Wege zur Geltung gelangt. Die ausführlichere Analyse dieser Annahme soll die Aufgabe von weiteren Versuchen sein. Jedenfalls hat es auf Grund der sowohl in bezug auf die Methode wie auch in bezug auf die Teilergebnisse bis zu einem gewissen Grade abweichenden Versuche von *Tusch* und *Moser* den Anschein, als ob in dieser Hinsicht auch die höheren Segmente des Rückenmarks eine Rolle spielen würden.

Schliesslich erscheint es uns als wesentlich, die Beobachtung hervorzuheben, dass infolge der Anwendung der quantitativen *Shwartzman*-Methode bei jedem (ausser einem einzigen) der mit Sevenal behandelten Tiere das *Shwartzman*-Phänomen auftrat — nur in geringerer Ausdehnung und nach konzentrierter intradermaler Sensibilisierung —, wobei aber die Narkose trotzdem die Entstehung der mit dem *Shwartzman*-Phänomen regelmässig einhergehenden Leukopenie verhinderte. Diese Feststellung erscheint deshalb als wichtig, weil eine Parallele zu jenen Versuchen von *Benetato* und Mitarbeitern [9] gezogen werden kann, in denen sie nachwiesen, dass das Zwischenhirn eine sehr wesentliche Rolle in der Entstehung der Leukozytose spielt: die unmittelbare Reizung der Regio hypothalamica durch Wechselstrom verursacht nämlich Leukozytose, auf diesen unbedingten Reiz kann ein bedingter Reflex ausgebildet und der ausgebildete bedingte Reflex wiederum durch eine zur Narkotisierung des Tieres

ungenügende Dosis Luminal gehemmt werden. Die von uns ausgeführten Versuche griffen das Problem von der entgegengesetzten Seite an, doch bestätigen sie in Übereinstimmung mit dem obigen Ergebnis von *Benetato* und Mitarbeitern, dass die während der Ausbildung des *Shwartzman*-Phänomens gesetzmässig eintretende Leukopenie in Sevenalnarkose ausbleibt. Dies ist ein neuerlicher Beweis dafür, dass das Phagozytensystem vom Zentralnervensystem reguliert wird.

Andererseits ist diese Beobachtung auch deshalb von Bedeutung, weil sie darauf hinweist, dass die in der Literatur immer stärker verbreitete Auffassung von *Stetson* über die Pathogenese des *Shwartzman*-Phänomens nicht vollständig zutrifft. In unseren Versuchen trat nämlich die hämorrhagische Nekrose trotz Ausbleibens der Leukopenie auf, so dass es unwahrscheinlich ist, dass die Leukopenie die primäre Ursache für die Entstehung der Nekrose bildet. Gegen die Auffassung von *Stetson* sprechen auch die Versuchsergebnisse von *Berthrong* und *Cluff* [10], laut derer das *Shwartzman*-Phänomen mit Heparin gehemmt werden kann, während jedoch gleichzeitig Leukopenie auftritt. Aus unseren Versuchen ging dagegen hervor, dass die Leukopenie beim Sevenalschlaf ausbleibt, und dass die Anzahl der Leukozyten zwischen physiologischen Grenzen schwankt, während gleichzeitig das *Shwartzman*-Phänomen auftritt, obgleich in vermindertem Ausmass und erst nach einer stärkeren Sensibilisierung. Auf Grund der beiden zwar auf verschiedene Weise erhaltenen, aber dennoch übereinstimmenden Beobachtungen wird man annehmen dürfen, dass die Leukopenie nicht die Ursache, sondern eine Begleiterscheinung des *Shwartzman*-Phänomens darstellt.

Zusammenfassung

Auf Grund von Versuchen an 19 Kaninchen wird das *Shwartzman*-Phänomen — im Gegensatz zur lokalen Anaphylaxie — durch partielle Schädigung des peripheren Nervensystems (Durchschneidung des N. ischiadicus, Denervierung eines Hautlappens) nicht beeinflusst, woraus sich auf einen grundsätzlich unterschiedlichen Pathomechanismus dieser beiden Erscheinungen folgern lässt. Laut der Ergebnisse der an 28 Kaninchen ausgeführten quantitativen *Shwartzman*-Versuche hemmt eine vor der Sensibilisierung und Auslösung bzw. nur vor der Auslösung eingeführte Sevenalnarkose relativ das *Shwartzman*-Phänomen. Wird nur die Auslösung im Sevenalschlafe ausgeführt, so kommt es zu einer unveränderten Ausbildung der Nekrose, während die Hyperämie stärker wird. An nicht narkotisierten Kontrolltieren verändern sich während der Ausbildung des *Shwartzman*-Phänomens die Zahl der roten Blutkörperchen, die Menge des Serumeiweisses und die einzelnen Eiweissfraktionen nur geringfügig, in nicht erfassbarer Weise, doch tritt eine ausgesprochene Leukopenie auf. Im Sevenalschlafe bleibt diese Leukopenie aus, was einerseits den engen Zusammenhang

zwischen dem Zentralnervensystem und dem mobilen Phagozytensystem beweist und andererseits als zweifelhaft erscheinen lässt, dass die Leukopenie in der Pathogenese des *Shwartzman*-Phänomens eine primäre Ursache darstellt.

LITERATUR

1. *Kesztyüs, L., Salánki, J.* und *Koller, M.:* Acta Microbiol. Hung. **2,** 11 (1955).
2. *Urbach, E.* und *Gottlieb, M. D.:* Allergy. Grune & Stratton. New York (1949).
   Kämmerer, H.: Handb. d. inn. Med. **6,** 362 (1954).
   Gratia, A. und *Linz, R.:* C. r. Soc. Biol. Paris. **109,** 585. (1932).
   Tusch, E. und *Moser, H.:* Ztschr. f. Immunforsch. **108,** 90 (1950).
   Hajós, K. und *Rajka, Ö.:* Asthma-Ekzema. Rényi Budapest (1944).
3. *Kolpakow E.:* Мед. Ж. Вшеукр. АН. **6.** 297 (1936).
4. *Mansfeld, G.:* Orvosok Lapja **4,** 321 (1948).
5. *Sdrodowski, P. F.:* Orvostud. Dok. Közp. Orvostud. Refer. Szemle Belgyógyászat **172,** (1954). (Referat.)
6. *Nasta, H.* und *Negelescu, V.:* Buletin stiintific. **3**/3, 919 (1951).
7. *Jensen, C.:* Acta Path. Microbiol. Scand. Suppl. **XIV** (1933).
   Jensen, C.: Die intrakutane Kaninchenmethode zur Auswertung von Diphtherietoxin und Antitoxin. Kopenhagen 1933.
8. *Stetson Jr. Ch. A.:* J. exp. Med. **93,** 489 (1951).
9. *Benetato, G., Thorescu, J.* und *Bacin, J.:* Schweiz. Med. Wschr. **23,** 513 (1946).
10. *Berthrong, M.* und *Cluff, L. E.:* J. Exp. Med. **98,** 331 (1953).
    Cluff, L. E.: J. exp. med. **98,** 349 (1953).

НЕРВНАЯ СИСТЕМА И ИММУНИТЕТ IV.

Влияние невротомии и наркоза на феномен Шварцмана

Л. Кестьюш, Г. Черньянски, М. Коллер и *Я. Шаланки*

Резюме

Согласно 19 экспериментам проведенным на кроликах, повреждение периферической нервной системы — в противоположность локальной анафилаксии — не оказывает влияния на реакцию Шварцмана, чем доказывается различность патомеханизмов этих двух феноменов. На основании количественных реакций Шварцмана, произведенных на 28 кроликах, авторы определили, что наркотизирование севеналом, применяемое перед подготовительными и разрешающими или только перед разрешающими инъекциями, относительно тормозит реакцию Шварцмана. У не наркотизированных контрольных животных, за период развития феномена Шварцмана, число эритроцитов, количество белка сыворотки и разных фракций не изменяется, но наступает выраженная лейкопения. В случае наркотизирования севеналом эта лейкопения отсутствует, чем доказывается существование тесной связи между центральной нервной системой фагоцитов, а — с другой стороны — становится сомнительным, является ли лейкопения первичным фактором феномена Шварцмана

NERVENSYSTEM UND IMMUNITÄT V.

DIE WIRKUNG VON NEUROTOMIE AUF DIE DIPHTHERIETOXIN-EMPFINDLICHKEIT DER HAUT

Von

L. KESZTYÜS, T. SZILÁGYI und H. CSERNYÁNSZKY

Pathophysiologisches Institut der Medizinischen Universität, Debrecen

(Eingegangen am 18. September 1954)

Im Laufe unserer vorhergehenden Untersuchungen [1] wurde festgestellt, dass auf einem seiner normalen Nervenverbindungen beraubten Hautbezirk die lokale Anaphylaxie, das *Arthus-Sacharow*-Phänomen, schwerer hervorgerufen werden kann ; die Reaktion kommt auf der denervierten Seite entweder überhaupt nicht zustande oder zeigt eine im Vergleich zur Kontrolle auf der über intakte Nervenverbindungen verfügenden Haut eine nur schwächere Intensität. Aus diesen Ergebnissen wurde der Schluss gezogen, dass dem peripheren Nervensystem in den Prozessen, die sich infolge der die lokale Anaphylaxie auslösenden Reinjektion abspielen, eine bedeutende Rolle zukommt. Es wurde angenommen, dass sich die Reaktionsfähigkeit des denervierten Gewebes vermindert, wobei aber auch die Möglichkeit ins Auge gefasst wurde, dass in solchen denervierten Geweben die Konzentration der anaphylaktischen Immunkörper oder des Antigens oder ihr Zusammentreffen, oder vielleicht der Ablauf der Antigen-Antikörper-Reaktion gestört wird.

Wie ersichtlich, ist es keineswegs leicht, eine Antwort auf die Frage zu geben, an welcher Stelle oder in welchen Teilprozessen des Pathomechanismus das Nervensystem das *Arthus-Sacharow*-Phänomen beeinflusst, da der Pathomechanismus dieses Phänomens allzu kompliziert ist, als dass es möglich wäre, die einfachen Zusammenhänge klar zu erfassen. Aus diesem Grunde versuchten wir eben, an Hand eines einfacheren Modellexperimentes festzustellen, wie und in welchem Ausmasse sich die Reaktionsfähigkeit der Haut ändert, wenn sie ihrer normalen Nervenverbindungen beraubt wird. Zu diesem Modellversuch wurde als makromolekularer Reizstoff das Diphtherietoxin gewählt, für dessen Anwendung als Indikator mehrere Gründe sprechen. Vor allem stellt es einen grossen Vorteil dar, dass das Diphtherietoxin mit Hilfe der *Jensen*schen intrakutanen Titrierung auch zur Feststellung quantitativer Zusammenhänge geeignet ist [2]. Ferner ist es von Bedeutung, dass — obwohl es sich ähnlich wie das Tetanustoxin nicht nur über das Blut und die Lymphe, sondern auch über die peripheren Nervenstämme verbreitet — nach den Untersuchungen von *Rachmanow* [3] seine Bewegung in den Nerven mit keiner destruktiven Veränderung einhergeht.

Methodik und Versuchsergebnisse

In den Vorversuchen sollte in erster Linie festgestellt werden, ob sich an den unverletzten hinteren Extremitäten von normalen Kaninchen ein Unterschied in den Ergebnissen der gleichzeitig durchgeführten *Jensen*schen Titrierung zeigt. Zu diesem Zwecke wurde an der hinteren Extremität von 2,5 bis 3,5 kg schweren Kaninchen oberhalb des Knöchels in eine depilierte Hautstelle von 5 bis 6 cm Durchmesser je 0,1 ml Diphtherietoxin von drei verschiedenen Verdünnungen intrakutan injiziert und das Ausmass der Hautreaktion nach 24 Stunden bestimmt. Auf der Injektionsstelle waren ohne Schwierigkeiten 4 Abstufungen der Reaktion zu unterscheiden, nämlich Nekrose, Hyperämie mit Ödem, einfache Hyperämie und schliesslich eine negative Reaktion. Die diesbezüglichen Ergebnisse sind in Tabelle I enthalten.

Tabelle I

Normale Kontrollkaninchen

Kaninchen Nr.	Linke Seite			Rechte Seite		
	Diphtherietoxin in ml					
	1×10^{-5}	3×10^{-5}	1×10^{-4}	1×10^{-5}	3×10^{-5}	1×10^{-4}
146.	−	++	+++	−	++	+++
147.	−	+	+	−	+	+
148.	−	±	++	−	±	++
149.	−	+	+	−	+	+
150.	−	++	++	−	++	++

− = negativ; + = Hyperämie; ++ = Hyperämie und Ödem; +++ = Nekrose.

Wie aus den Angaben der Tabelle I ersichtlich, löst Diphtherietoxin von gleicher Konzentration im allgemeinen auch eine Hautreaktion von gleicher Intensität an beiden hinteren Extremitäten aus. Die Reaktionsfähigkeit der symmetrisch an den gegenseitigen unverletzten Extremitäten befindlichen Hautstellen war also dem Diphtherietoxin gegenüber gleich gross. Die Dosis reagens minima des Toxins beträgt laut dieser Versuche 3×10^{-5} ml.

An weiteren 15 Kaninchen wurde an der einen hinteren Extremität der N. ischiadicus durchschnitten und 14 Tage nach dieser Operation sowohl an der unverletzten als auch an der neurotomisierten hinteren Extremität die *Jensen*sche Titrierung mit der im Vorversuch angewandten Technik vorgenommen. Die erhaltenen Ergebnisse werden in Tabelle II gezeigt.

Aus den Angaben der Tabelle II geht klar hervor, dass sich die Reaktionsfähigkeit der Haut an der Extremität mit durchschnittenem N. ischiadicus Diphtherietoxin gegenüber abgeschwächt hat. An den als Kontrolle dienenden Hautbezirken mit intakten Nervenverbindungen der operierten Versuchstiere beträgt das Reagenzminimum der Toxindosis 1 bis 3×10^{-5} ml, an der Extremität mit durchschnittenem Ischiadicus dagegen 2 bis 3×10^{-4} ml. Im Endergebnis ist also die Reaktionsfähigkeit der Haut gegen Diphtherietoxin an der ischiadicusdurchschnittenen Seite um eine Grössenordnung geringer.

In diesen Versuchen war die Denervierung nicht vollständig, weil die längs der Gefässe verlaufenden Nervenfasern intakt blieben. Deshalb ging im folgenden das Bestreben dahin, auch die periarteriellen Nervengeflechte eines bestimmten Hautbezirkes zu durchschneiden. Zu diesem Zwecke wurden mit Hilfe der von *Mansfeld* empfohlenen Methode [4] an 5 Kaninchen in zwei Operationen an der einen Seite des Rückens ein denervierter Hautlappen von 4 bis 6 cm Durchmesser präpariert. An diesen sowie an den ihnen symmetrisch gelegenen, aber unverletzten Hautbezirken der Gegenseite wurde gleichzeitig die Titrierung mit Diphtherietoxin durchgeführt. Die so ermittelten Ergebnisse sind in Tabelle III zusammengefasst.

Wie aus Tabelle III zu ersehen ist, beträgt das Reagenzminimum der Diphtherietoxindosis auf dem denervierten Hautbezirk 3×10^{-4} ml, während es gleichzeitig auf der unverletzten, symmetrisch zur denervierten Hautstelle gelegenen Haut 3×10^{-5} ml ausmacht. Infolge der vollständigen Denervierung hat also die Reaktionsfähigkeit der Haut gegen Diphtherietoxin gleichfalls um eine Grössenordnung abgenommen.

Tabelle II

Kaninchen mit durchschnittenem N. ischiadicus

Kaninchen Nr.	Extremität mit durchschnittenem N. ischiadicus			Unverletzte Kontrollextremität			
	Diphtherietoxin in ml						
	1×10^{-4}	2×10^{-4}	3×10^{-4}	5×10^{-5}	1×10^{-5}	3×10^{-5}	1×10^{-4}
151.	−	−	+	−	++	++	
152.	−	−	+	−	+	++	
153.	−	−	+	−	++	+++	
154.	−	−	+	−	+	++	
155.	−	−	+	−	++	+++	
156.	−	+	++	−	+	++	
157.	−	++	++	−	+	++	
158.	−	±	+	−	++	+++	
159.	+	++	+++	−	+++	+++	
160.	−	+++	+++		−	+	++
161.	−	+	++		−	+	++
162.	−	±	+		−	+	++
163.	−	−	+		−	++	+++
164.	−	−	+		−	++	+++
165.	−	−	+		−	+	+++

− = negativ; + = Hyperämie; ++ = Hyperämie und Ödem; +++ = Nekrose.

Tabelle III

Kaninchen mit denerviertem Rückenhautlappen

Kaninchen Nr.	Denervierter Hautlappen		Unverletzte Kontrollrückenhaut		
	Diphtherietoxin in ml				
	1×10^{-4}	3×10^{-4}	1×10^{-5}	3×10^{-5}	1×10^{-4}
166.	−	+	±	+++	
167.	−	±	−	+++	
168.	±	+		+++	+++
169.	−	+		+++	+++
170.	−	−		+++	+++

− = negativ; + = Hyperämie; ++ = Hyperämie und Ödem; +++ = Nekrose.

Diskussion

Unsere Versuche bezeugen in eindeutiger Weise, dass eine gleiche Dosis desselben Diphtherietoxins zur gleichen Zeit am gleichen Kaninchen einen unterschiedlichen Titer aufweist, je nachdem ob der zur Titrierung gewählte Haut-

bezirk über intakte neurale Verbindungen verfügt oder nicht. Auf dem denervierten Hautbezirk werden nämlich die charakteristischen Hautveränderungen erst durch eine Toxinmenge hervorgerufen, die um eine Grössenordnung grösser ist. Zu einer analogen Feststellung gelangte auch *Pigalew* [5], indem es das denervierte Ohr von Kaninchen unmittelbar nach der Denervierung aufschnitt und auf die Wunde einen mit Diphtherietoxin befeuchteten Watte-Mulltampon befestigte. An den ähnlich behandelten Kontrollkaninchen, deren Ohrnerven unverletzt geblieben waren, wurde die Wunde innerhalb 24 Stunden trübe und speckig, wobei sich nach 48 Stunden ein schmutziger, festhaftender »diphtheritischer« Belag ausbildete. Am 3.—4. Tage trat Eiterung auf, während an den Tieren mit denervierten Ohren mehr als die Hälfte der Wunden 24 bis 48 Stunden ohne Belag blieb und erst dann zu eitern begann.

Gegen die Versuchsmethode von *Pigalew* lassen sich in mehrfacher Hinsicht Bedenken erheben. Vor allem sei erwähnt, dass nach *Lasowsky* und *Kogan* [6] das Kaninchenohr ein denkbar ungeeignetes Objekt für Denervierungsversuche darstellt, da die zu durchtrennenden Nn. auricularis, occipitalis und facialis variabel verlaufen und sich verästeln, und das Ohr ausserdem auch vom Halssympathicus und vom Vagus innerviert wird. Wahrscheinlich ist dies auch die Ursache, dass die Ergebnisse von *Pigalew* eine grössere Streuung zeigen. Hiermit lässt sich auch der Umstand erklären, dass *Pigalew* gezwungen war, ausserordentlich akute Versuche auszuführen, denn er stellte selber fest, dass wenn zwischen der Neurotomie und dem Hauptversuch mit Einspritzung des Diphtherietoxins eine längere Zeitspanne als 2 bis 4 Tage verging, zwischen der Reaktionsfähigkeit der operierten und der Kontrollkaninchen kein Unterschied festgestellt werden konnte. Unserer Meinung nach blieben in den Versuchen von *Pigalew* die zu erwartenden peripheren Gewebsveränderungen nach der Denervierung aus; wenn er dennoch Unterschiede in der Reaktionsfähigkeit der operierten und der Kontrolltiere beobachtete, so dürfte dies auf die durch die Operation auf das Nervensystem ausgeübten Schockeffekte zurückzuführen sein. Nach Abklingen des Schockes konnte er dann nach 24 bis 48 Stunden keinerlei Unterschiede mehr zwischen den Kontrollkaninchen und den operierten Kaninchen nachweisen. Diese Technik lässt sich des weiteren auch insofern kritisieren, als er die angewandte Toxinmenge nicht exakt mass (er befeuchtete den auf die Wunde gelegten Watte-Mulltampon mehrere Male mit konzentriertem Toxin), und schliesslich sei noch erwähnt, dass er andere Individuen als Kontrolle zu Vergleichszwecken verwendete.

In unseren Untersuchungen wurde versucht, diese beanstandeten Bedingungen auszuschalten, so dass es möglich ist, aus ihnen bestimmtere Folgerungen zu ziehen. Die Abschwächung der Reaktionsfähigkeit des denervierten Hautbezirkes wurde annähernd quantitativ gemessen und dabei festgestellt, dass die Diphtherietoxinempfindlichkeit der Haut nach der Schädigung der neuralen Verbindungen um ungefähr eine Grössenordnung abgenommen hatte. Die

Abnahme lässt sich auch noch zwei Wochen nach der Denervierung gut nachweisen. Die Abnahme der Reaktionsfähigkeit ist in erster Linie auf die Ausschaltung der peripheren sensiblen und motorischen Nerven zurückzuführen, da kein Unterschied in der Toxinempfindlichkeitsabnahme der ischiadicusdurchschnittenen (also vor allem somatisch denervierten) Hautgebiete und der nach der Methode von *Mansfeld* operierten (also auch in der vegetativen Innervation gestörten) Hautlappen wahrgenommen werden konnte.

Gestützt auf die Versuche von *Pigalew* zog *Speransky* [7] die Folgerung, dass man in der Diphtherie keinen festen Boden hat, der genügte, die Lokalmanifestationen der Krankheit als das Resultat des direkten Kontakts des Toxins mit jedem der betreffenden Gewebselemente anzusehen, sondern dass die Majorität dieser Erscheinungen ihren Ursprung den Veränderungen verdankt, die das Toxin innerhalb des Netzwerkes des Nervensystems hervorruft. Auf Grund unserer Ergebnisse verneinen und verwerfen wir keineswegs die spezifische Lokalmanifestation des Diphtherietoxins, da ja auch das denervierte Gewebe mehr oder minder auf das Toxin reagiert, obgleich in geringerem Ausmass als der über intakte neurale Verbindungen verfügende Hautbezirk. Unserer Meinung nach wird der lokale Effekt des Toxins vor allem quantitativ durch das Nervensystem beeinflusst.

Der Umstand, dass die Schädigung der neuralen Verbindungen die Reaktionsfähigkeit des zu ihnen gehörigen Gebietes vermindert, lässt sich biologisch gut erklären. Es ist nämlich eine allgemeine Gesetzmässigkeit, dass ein Organismus desto differenzierter ist, je besser er sich an seine Umgebung anzupassen vermag. Die Anpassung an die Umgebung wird bei den höheren Tieren durch das Nervensystem gewährleistet. Die Schädigung des Nervensystems hat also zwangsläufig eine schlechtere Anpassung an die Umgebung zur Folge, d. h. dass der Organismus mit geschädigtem Nervensystem bloss auf stärkere physiologische und pathologische makromolekulare Reize reagiert. Was in den hier beschriebenen Versuchen beobachtet wurde, ist also letztlich nichts anderes, als der Ausdruck dieser allgemeinen biologischen Gesetzmässigkeit.

Zum Ausgangspunkt unserer Untersuchungen zurückkehrend, lässt sich demnach auf Grund der mit Diphtherietoxin ausgeführten Modellversuche mit grosser Wahrscheinlichkeit behaupten, dass unter den Ursachen für das Ausbleiben bzw. für die abgeschwächte Intensität der lokalen Anaphylaxie, d. i. des *Arthus-Sacharow*-Phänomens, auf dem seiner normalen neuralen Verbindungen beraubten Hautgebiete die Verminderung der Empfindlichkeit der denervierten Haut eine Rolle spielt. Auf Grund der zahlenmässigen Ergebnisse dürfte es dagegen unwahrscheinlich sein, dass die Verminderung der Hautreaktionsfähigkeit um eine Grössenordnung allein und ausschliesslich für die schwerere Auslösbarkeit der lokalen Anaphylaxie an der Haut mit verletzten neuralen Verbindungen verantwortlich ist. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um klarzustellen, ob ein Unterschied in der Konzentration der anaphylaktischen

Antikörper bzw. Antigene im unverletzten und im Gewebe mit geschädigter Innervation besteht und ob die Antigen-Antikörper-Reaktion in beiden Geweben gleichmässig abläuft oder nicht.

Zusammenfassung

Laut Versuchen an 25 Kaninchen, deren N. ischiadicus an der einen hinteren Extremität durchschnitten bzw. an denen ein Hautlappen denerviert wurde, war die Diphtherietoxinempfindlichkeit der denervierten Haut im Vergleich zu der als Kontrolle dienenden unverletzten Haut um eine Grössenordnung geringer. Die Verneinung des spezifischen Hauteffektes des Diphtherietoxins ist experimentell nicht begründet, das Nervensystem beeinflusst den spezifischen Hauteffekt in erster Linie quantitativ. Auf Grund der ausgeführten Versuche darf angenommen werden, dass die Abnahme der Reaktionsfähigkeit der Haut eine der Ursachen für das Ausbleiben bzw. für die Verminderung der Intensität der lokalen Anaphylaxie auf der denervierten Haut bildet.

LITERATUR

1. *Kesztyüs, L., Salánki, J.* und *Koller, M.:* Acta Microbiol. Hung. **2,** 11 (1955).
2. *Jensen, C.:* Acta Path. Microbiol. Scand. Suppl. XIV. (1933); Die intrakutane Kaninchenmethode zur Auswertung von Diphtherietoxin und Antitoxin. Kopenhagen 1933.
3. *Rachmanow:* Inaug. Diss. S. P. 1910. Zit. nach 5.
4. *Mansfeld, G.:* Orvosok Lapja **4,** 321 (1948).
5. *Pigalew, I.:* Ztschr. ges. exper. Med. **63,** 643 (1928).
6. *Lasowsky, J. M.* und *Kogan, M. M.:* Virchows Arch. **292,** 428 (1934).
7. *Speransky, A. D.:* Grundlagen der Theorie der Medizin. Springer, Berlin. 1950, S. 250—251.

НЕРВНАЯ СИСТЕМА И ИММУНИТЕТ V.

Влияние невротомии на чувствительность кожи к дифтерийному токсину

Л. Кестьюш, Т. Силадьи и *Г. Черньянски*

Резюме

Согласно экспериментам проведенным на задних конечностях с перерезанным седалищным нервом и на денервированных кожных лоскутах 25 кроликов, чувствительность к дифтерийному токсину кожи с повреждёнными нервными соединениями — по сравнению с неповрежденными контролями — снизилась на один порядок величин. Отрицание специфического действия дифтерийного токсина на кожу не подтверждено экспериментами. Воздействие нервной системы оказываемое на специфический кожный эффект носит в первую очередь количественный характер. На основании проведенных экспериментов авторы определили, что понижение реактивности кожи играет роль в том, что на коже с поврежденными нервными соединениями локальная анафилаксия или отсутствует, или появляется с пониженной интенсивностью.

ÜBER DIE EIGENSCHAFTEN DER CHLORAMPHENICOL-RESISTENTEN E. COLI O : 111, B : 4-STÄMME

Von

L. VÁCZI, K. GÁL und M. KUBINYI

Staatl. Institut für Volksgesundheitswesen, Budapest

(Eingegangen am 14. Oktober 1954)

Das Chloramphenicol ist besonders bei enteralen Erkrankungen (Typhus, Dysenterie, Säuglingsdyspepsie) heute bereits ein allgemein angewendetes Mittel. Seitdem unter den pyogenen Krankheitserregern, vor allem unter den Staphylokokken, immer mehr penicillinresistente Stämme vorkommen, wird das Chloramphenicol auch in der Therapie der durch diese Bakterien hervorgerufenen Erkrankungen oft verwendet.

Die Literaturangaben weisen darauf hin, dass in den Ländern, wo das Chloramphenicol seit längerer Zeit und weit verbreitet angewendet wird, die Zahl der gegen dieses Antibiotikum resistenten Stämme steigt. Deswegen erachteten wir es als notwendig, Untersuchungen bezüglich einiger Fragen der heute noch vollkommen ungeklärten Chloramphenicol-Resistenz durchzuführen.

Im ersten Teil unserer Untersuchungen sammelten wir in den ersten drei Monaten des Jahres 1954 100 pathogene *E. coli*-Stämme (im weiteren Coli dyspepsiae-Stämme) von an Enteritis erkrankten Säuglingen. Von den 100 Stämmen waren 86 O : 111, B : 4 ; 12 O : 55, B : 5 und 2 O : 26, B : 6. Wir untersuchten die Empfindlichkeit der Stämme gegenüber Chloramphenicol. Die Empfindlichkeit von 91% der untersuchten Stämme betrug 1—2 μg/ml, die von 9 hingegen 4—16 μg/ml. *Auf Grund dieser Angaben müssen wir also noch nicht mit Chloramphenicol-resistenten Coli dyspepsiae-Stämmen rechnen.*

Als erster Teil der auf den Mechanismus der Chloramphenicol-Resistenz bezüglichen Untersuchungen wurden Coli dyspepsiae O : 111, B : 4-Stämme in vitro resistent gemacht. Wir impften die Stämme jeden zweiten Tag in Chloramphenicol in steigender Konzentration enthaltende Bouillon weiter. Zu den Untersuchungen wurden vier Varianten des Typs O : 111 verwendet, und zwar die geissellosen (O : 111, B : 4H-), die begeisselten (O : 111, B : 4H2, O : 111, B : 4H12) phagempfindlichen und (O : 111, B : 4H12) phagresistenten Stämme. Die Stämme adaptierten sich schnell an das Chloramphenicol und nach einmonatiger Passage wurden sämtliche resistent gegenüber 100 μg/ml Chloramphenicol ; ihre Resistenz wuchs somit auf das 30—40fache. Im Laufe dieses Vorganges untersuchten wir die morphologischen und biochemischen Veränderungen, die Veränderung in der Bewegung und Antigenstruktur sowie die Gestaltung des

Phagtypus des empfindlichen und des resistenten Stammes. Die morphologischen Veränderungen werden in den Abbildungen 1/*a* und 1/*b* veranschaulicht.

Aus diesen ist ersichtlich, dass die resistenten Bakterien ihre charakteristische Form verlieren und eine sehr lange, fadenartige Form aufzeigen. Das Protoplasma des Bakteriums färbt sich ungleichmässig, selbst bei einfacher Färbung sind sich mit verschiedener Intensität färbende Teile vorhanden.

Abb. 1/a. E. coli O : 111, B : 4, Chloramphenicol-empfindlicher Stamm

Abb. 1/b. E. coli O : 111, B : 4, gegenüber 100 μg/ml Chloramphenicol-resistenter Stamm

Zur Beobachtung der in den biochemischen Eigenschaften eventuell eintretenden Veränderungen untersuchten wir die Kohlehydratvergärung, die Schwefelwasserstoff- und Indolbildung der empfindlichen sowie der resistent gemachten Stämme und führten die Methylrot- und die Voges-Proskauersche Reaktion durch. *Hinsichtlich dieser Eigenschaften fanden wir keinen Unterschied zwischen den empfindlichen und den resistenten Stämmen.*

Im weiteren untersuchten wir, ob sich die Antigenstruktur der resistenten Stämme von jener der empfindlichen Stämme unterscheidet. Zur Entscheidung dieser Frage prüften wir die Bewegung der begeisselten resistenten Varianten, die Eigenschaften des durch resistente Stämme erzeugten Immunserums und die Gestaltung der Phagtypen der resistenten Stämme. Die Ergebnisse sind in Abb. 2 und Tabelle I dargestellt.

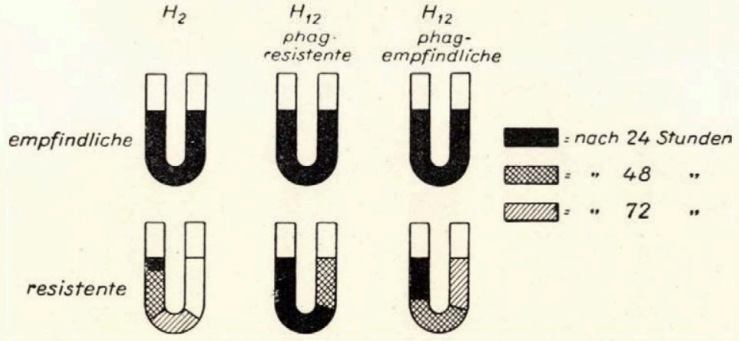


Abb. 2. Bewegung von Chloramphenicol-empfindlichen und resistenten begeisselten *E. coli* O : 111, B : 4-Stämmen in U-Röhre

Aus der Abbildung ist klar ersichtlich, dass sich die Bewegung der resistenten Stämme im Verhältnis zu dem empfindlichen Stamm verändert. Teils verlieren sie fast vollkommen ihre Bewegungsfähigkeit (H2-Stamm), teils verlangsamt sich ihre Bewegung in ausserordentlichem Masse.

Tabelle I

Agglutinintiter der durch empfindliche und resistente O : 111, B : 4H2-Stämme erzeugten Sera

Sera	O	B	H	O	B	H
	Antigen des empfindlichen Stammes			Antigen des resistenten Stammes		
Empfindlich	4200	3000	4500	1100	2800	2700
Resistent	2800	450	650	3600	4100	5600

Im Zusammenhang mit der Antikörperproduktion ist es aus den Literaturangaben bekannt, dass bei mit Chloramphenicol behandelten Kranken der Antikörpertiter im allgemeinen niedrig ist. Ebendeswegen führten wir Versuche durch, ob die Immunreaktion des Organismus im Laufe der durch Chloramphenicol-empfindliche bzw. -resistente Stämme erzeugten Immunisierung identisch ist. In unseren Experimenten verglichen wir bei Kaninchen die Immunkörperbildung auf Wirkung von identischen Mengen des empfindlichen und des resistenten Stammes. Zu den Untersuchungen wurden acht Kaninchen verwendet. Von diesen Tieren impften wir drei mit dem empfindlichen Stamm und fünf mit dessen resistenter Variante. Die Impfungen wurden in Abständen von vier Tagen mit steigenden Mengen Suspensionen von iden-

tischer Keimzahl ausgeführt. Nach drei Wochen liessen wir die Kaninchen verbluten und bestimmten den Agglutinin gehalt der Sera.

Aus der Tabelle I ist ersichtlich, dass der resistente Stamm keineswegs einen niedrigeren Antigenreiz darstellt als der empfindliche. Auf die Wirkung des ersteren erhielten wir sogar eher ein Serum höheren Titers. Die Kreuzagglutinationsversuche zeigen jedoch auf die Veränderungen in den B und H Antigenen des resistenten Stammes. Darauf verweisen auch unsere Beobachtungen, dass nämlich das durch den empfindlichen Stamm erzeugte Immunserum durch seine resistente Variante nicht vollkommen erschöpft werden kann. Die Antigenstruktur des resistenten Stammes ist also etwas ärmlicher.

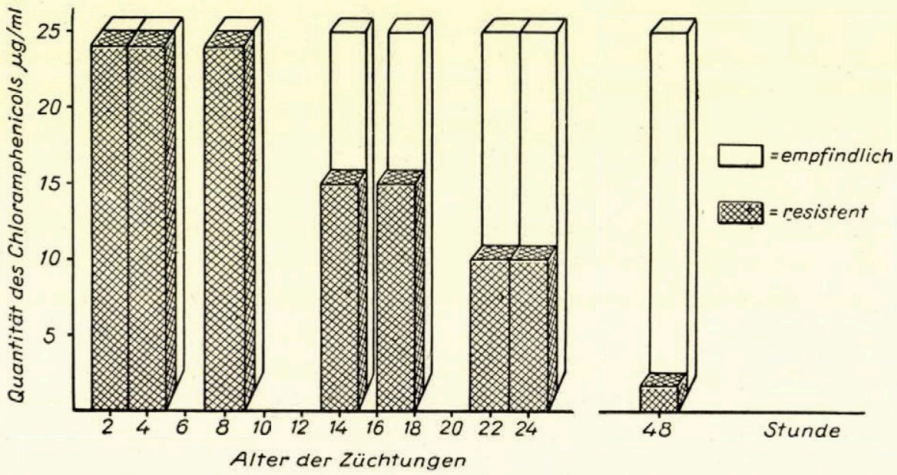


Abb. 3. Veränderung der Chloramphenicolkonzentration in verschieden alten Bouillonzüchtungen von empfindlichen und resistenten *E. coli* O : 111, B : 4-Stämmen

Auf Veränderungen in den Oberflächenantigenen unserer in vitro resistenten Coli dyspepsiae-Stämme lässt auch die an ihren Phagtypen beobachtete Veränderung schliessen. Von drei unserer begeisselten Stämme veränderte sich der Phagtypus zweier. Der dritte begeisselte Stamm war auch zu Beginn der Untersuchungen phagresistent, und seine antibiotikumresistente Variante erwies sich ebenfalls als phagresistent.

Als Ursache der in vitro eingetretenen Resistenz erachteten wir, dass die Stämme deswegen resistent wurden, weil sie einen das Chloramphenicol zerstörenden Stoff erzeugen. Zur Entscheidung der Frage wurden folgende Untersuchungen durchgeführt.

Wir züchteten den resistenten Stamm in 25 µg/ml Chloramphenicol enthaltender Bouillon und bestimmten die Menge des Chloramphenicols in verschiedenen Zeitabständen in Bouillon. Zur Bestimmung wurde ein empfindlicher Flexner-Stamm verwendet. Die Untersuchungsergebnisse werden in Abb. 3 veranschaulicht.

Daraus ist ersichtlich, dass die Menge des Chloramphenicols in den ersten acht Stunden unverändert blieb. Währenddessen begann das Bakterium, sich zu vermehren. Von der zehnten Stunde an nahm die Menge des Chloramphenicols stufenweise ab und in 48 Stunden verschwand es vollkommen aus der Bouillon. Der Abbau begann also erst dann, als der Zerfall der Bakterien bereits in vollem Gange war.

Der in Abb. 3 demonstrierte Versuch wirft die Frage auf, ob der Abbau des Chloramphenicols durch die resistenten Stämme die Folge der Vermehrung eines bereits in dem empfindlichen Stamm vorhandenen Enzyms ist, oder die Folge der Bildung eines neuen Enzyms. Die Untersuchungen zeigten, dass die Lysata der empfindlichen Stämme das Chloramphenicol während 48 Stunden in nachweisbarem Masse nicht zersetzen. Wir müssen also vermuten, dass die Ursache des Abbaus ein sich in der resistenten Zelle während der Adaptation gebildetes, neues adaptives Ferment ist. Dies kann sich scheinbar lediglich nach dem Zerfall des Bakterienkörpers aus der Zelle befreien, deswegen kommt seine Wirkung nachweisbar nur am Ende der logarithmischen Phase und im Abschnitt des ständigen bzw. des absteigenden Wachstums zur Geltung.

Bei den Versuchen beobachteten wir, dass das Wachsen der resistenten Stämme im Verhältnis zu dem empfindlichen Stamm wesentlich langsamer vor sich ging. Die resistenten Stämme streben in Bouillon wegen ihres gesteigerten Oxygenanspruches ein Wachstum auf der Oberfläche an. Wir untersuchten also die Dehydrogenase-Aktivität der empfindlichen und der resistenten Stämme. Zu diesem Zwecke prüften wir die Reduktionsaktivität von gewaschenen Suspensionen der empfindlichen und resistenten Stämme in Anwesenheit von Laktose-, Dextrose- und Galaktose-Donatoren, als Wasserstoffakzeptor TTC (Triphenyltetrazoliumchlorid) verwendend, unter aeroben und anaeroben Umständen. Wie wir in Tabelle II darstellten, blieb die Reduktionsaktivität der resistenten Stämme bedeutend hinter der der empfindlichen Stämme zurück.

Tabelle II

TTC Reduktionsaktivität der Varianten des E. coli O : 111, B : 4H2-Stammes in µg Stickstoff gerechnet

Donater	Quantität des reduzierten TTC in µg unter					
	aeroben			anaeroben		
	Umständen bei					
	empfindlichen	resistenten	in Rückgestaltung befindlichen	empfindlichen	resistenten	in Rückgestaltung befindlichen
	Stämmen					
Dextrose	23,0	3,1	3,6	36,0	6,3	7,8
Lactose	4,2	1,4	1,7	2,7	0,2	0,1
Galactose	16,4	5,7	6,1	26,0	9,5	11,0

Dies weist darauf hin, dass *die Adaptation der resistenten Stämme, die Funktion des adaptiven Enyzms, aus irgendeinen Grund der des empfindlichen Stammes gegenüber gehemmt ist.*

Im weiteren wollten wir noch auf die Frage Antwort erhalten, in welchem Masse die Resistenz in vitro konstant bleibt. Zu diesem Zwecke impften wir die resistenten Stämme ein Monat lang in Chloramphenicol-freier Bouillon weiter. Die Resistenz unserer Stämme *nahm nach 30 Passagen in geringem Masse ab.*

Besprechung

Ein Teil unserer Beobachtungen wird durch Literaturangaben bezüglich anderer Bakterien bestätigt. *Bergersen* [1] wies ähnliche morphologische Veränderungen bei Chloramphenicol-resistent gemachten *E. coli*-Stämmen nach. *Carrère* u. Mitarb. [2] fanden — unseren Untersuchungen ähnlich — hinsichtlich biochemischer Eigenschaften keine Unterschiede zwischen den empfindlichen und resistenten *E. coli*- und *B. proteus*-Stämmen. Laut Untersuchungen von *Sagebiel* [3] und *Dulong de Rosnay* u. Mitarb. [4] verlieren die Chloramphenicol-resistenten *S. typhi*-Stämme ihr H-Antigen. Diese Beobachtung wird bei Chloramphenicol-resistenten Coli dyspepsiae-Stämmen auch durch eigene Untersuchungen bestätigt.

Subrahmanjan [5] fand, dass sich das Bakteriumantigen auf Wirkung von Chloramphenicol so veränderte, dass es nicht fähig war, die Bildung von spezifischen Antikörper hervorzurufen. Darin liegt seines Erachtens die Ursache des bei Chloramphenicolbehandlung wahrgenommenen niedrigen Antikörpertiters. Laut unserer Untersuchungen vertreten jedoch die resistenten Coli dyspepsiae-Stämme denselben Antigenreiz wie die empfindlichen. Die Abnahme des Antikörpertiters ist damit also nicht zu erklären.

Die morphologischen Veränderungen, die wir während des Erlangens der Resistenz wahrgenommen haben, sowie die im Geisselapparat und in der oberflächlichen Antigenschicht der Stämme eingetretenen Änderungen lassen darauf schliessen, dass das Wesentliche der dem Chloramphenicol gegenüber in vitro zustandegekommenen Resistenz durch auf der Oberfläche der Zelle erfolgte Veränderungen gegeben wird. Möglich ist, dass sich der Mikroorganismus dem Chloramphenicol gegenüber durch Änderung seiner Permeabilitätsverhältnisse verteidigt. Nach *Mirzanos* [6] Beobachtung ist der Ribonucleinsäuregehalt der in vivo und in vitro antibiotikumresistenten Stämme wesentlich grösser als der der empfindlichen Stämme. Die vermehrte Ribonucleinsäure ermöglicht einen kompakteren Aufbau der Zellwand. Im Laufe unserer Immunisierungsversuche fanden wir lediglich in den B- und H-Antigenen Änderungen, im O-Antigen hingegen war kein wesentlicher Unterschied zu erkennen.

Durch die Veränderung der Oberfläche sind auch die in der Vermehrungsgeschwindigkeit der resistenten Stämme sowie in der Bildung ihres adaptiven Enzyms den empfindlichen Stämmen gegenüber bestehenden Unterschiede zu

erklären. Die Vermehrung der Stämme verlangsamt sich infolge der Geschwindigkeitsabnahme der durch die Dehydrogenase-Enzymsysteme katalysierten Prozesse.

Die biochemischen Eigenschaften der empfindlichen und der resistenten Coli dyspepsiae O : 111-Stämme sind dieselben. Es besteht also kein qualitativer Unterschied zwischen den Enzymsystemen der empfindlichen und der resistenten Varianten. Unsere TTC-Reduktionsversuche lenken jedoch auf *wesentliche quantitative Unterschiede* die Aufmerksamkeit. In Anbetracht dessen, dass das Chloramphenicol auf die Dehydrogenase-Systeme keine Wirkung ausübt, kann die Ursache dieses quantitativen Unterschiedes darin liegen, dass die Verbindung zwischen dem Enzym und seinem Substrat eben wegen der Veränderung der Oberflächenstruktur des Bakteriums behindert ist. Deshalb vermindert sich die Aktivität des Dehydrogenase-Enzyms des resistenten Stammes im Verhältnis zu dem empfindlichen Stamm.

Wir möchten nun die Frage beantworten, ob es möglich ist, die in der Antigenstruktur und in den Oberflächenverhältnissen des Mikroorganismus eintretenden Veränderungen mit seiner biochemischen Aktivität in Einklang zu bringen. Vom Standpunkt der Antigenstruktur und der Oberflächenverhältnisse besteht ein wesentlicher Unterschied zwischen den S- und R-Varianten der Bakterien. Auf Grund der Untersuchungen von *Soru* [7] ist bekannt, dass die Dehydrogenase-Aktivität der R-Varianten wesentlich niedriger ist als die der S-Varianten. Den Veränderungen im Antigensystem der Oberfläche und denen in der Oberfläche selbst folgen die quantitativen Veränderungen der Enzymaktivität. Nach den heutigen Vorstellungen *(Hewitt)* spielt sich die Fermentation der Kohlehydrate, die Glykolyse, in der Nähe der Zelloberfläche ab. So ist verständlich, dass sich der Umwandlung der Oberfläche zufolge auch die Geschwindigkeit der durch die Dehydrogenase-Enzymsysteme katalysierten Prozesse verändert.

Ausser den an der Zelloberfläche eintretenden, eventuell auch die Permeabilität beeinflussenden Veränderungen sind die resistenten Stämme fähig, das Chloramphenicol zu inaktivieren. Nach *Smith* und *Worell* [8] vermögen die Coli-Stämme, die Nitrogruppe des Chloramphenicol-Moleküls zu einer Aminogruppe zu reduzieren und die Amidbindung zu hydrolysieren. Dadurch verliert das Chloramphenicol seine Wirkung. Nach den Untersuchungen von *Merkel* und *Steers* [9] besteht ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen dem Chloramphenicol-Reduktionsvermögen und der Resistenz gegenüber Chloramphenicol der resistenten Stämme. Die Chloramphenicol-Inaktivierungsfähigkeit der in vitro resistent gemachten Coli dyspepsiae-Stämme wuchs in ausserordentlichem Masse im Verhältnis zu den empfindlichen Stämmen an. Unsere weiteren Untersuchungen werden entscheiden, ob diese Eigenschaft tatsächlich die Folge der Bildung eines neuen adaptiven Enzyms oder die Folge der schnellen Vermehrung des in den empfindlichen Zellen vorhandenen präformierten Enzyms sei.

Die weiter oben besprochenen Ergebnisse weisen jedoch darauf hin, dass in der Entwicklung der Chloramphenicol-Resistenz nicht die Anwachsung der Chloramphenicol Reduktase-Aktivität, sondern die Veränderung der Zelloberfläche und des Stoffwechsels die Hauptrolle spielt.

Zusammenfassung

1. Unter 100 von an Enteritis erkrankten Säuglingen herrührenden Coli dyspepsiae-Stämmen wurden keine Chloramphenicol-resistenten Stämme gefunden.

2. Begeisselte und geissellose Varianten von *E. coli* O : 111, B : 4-Stämmen wurden Chloramphenicol gegenüber in vitro in kurzer Zeit resistent. In einem Monat erreichen die Stämme das 30—40fache ihrer ursprünglichen Resistenz, die sie nur sehr langsam verlieren.

3. Zwischen den biochemischen Eigenschaften der empfindlichen und der resistenten Stämme besteht kein qualitativer Unterschied.

4. In vitro resistente Stämme zeigten charakteristische morphologische Veränderungen. Auch die Antigenstruktur ihrer Oberfläche veränderte sich. Vom Gesichtspunkt des O-Antigens vertreten die resistenten Stämme denselben Antigenreiz wie die empfindlichen Stämme. Bezüglich des Oberflächenantigens sind sie jedoch etwas ärmer.

5. Die Bewegung der resistenten Stämme veränderte sich, wurde langsamer ; in geringem Masse veränderte sich auch ihre Empfindlichkeit dem spezifischen Phag gegenüber.

6. Mit den auf der Oberfläche der Stämme eingetretenen Strukturveränderungen verändert sich auch die Geschwindigkeit der durch die Dehydrogenase-Enzymsysteme katalysierten Prozesse. Die in Anwesenheit verschiedener Zuckerarten gemessene Reduktionsaktivität der resistenten Stämme nimmt in grossem Masse ab.

7. Die resistenten Stämme produzieren einen enzymartigen Stoff und mit Hilfe dessen bauen sie das in ihrer Umgebung befindliche Chloramphenicol ab.

LITERATUR

1. *Bergersen, F. J.* : J. gen. Microbiol. **9,** 353 (1953).
2. *Carrère, L.* et al. : Rev. d'Immunol. **15,** 353 (1951).
3. *Sagebiel, W.* : Arch. Hyg. Bakt. **135,** 222 (1951).
4. *Dulong de Rosnay, C.* et al. : C. R. Soc. Biol. **146,** 1742 (1952).
5. *Subrahmanjan, P.* : ref. Bull. Hyg. **28,** 324 (1953).
6. *Mirzano, D.* : Japan J. Med. Sci. and Biol. **6,** 57 (1953).
7. *Soru, E.* : C. R. Soc. Biol. **120,** 232 (1935).
8. *Smith, G. N.* und *Worrell, C. S.* : J. Bact. **65,** 313 (1953).
9. *Merkel, I.* und *Steers, E.* : J. Bact. **66,** 389 (1953).

ИЗМЕНЕНИЕ СВОЙСТВ ШТАММОВ E. COLI O : 111, B : 4 ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ХЛОРАМФЕНИКОЛА

Л. Ваци, К. Гал и М. Кубиньи

Резюме

1. Среди 100 штаммов E. coli O : 111, B : 4, выделенных из случаев энтерита грудных младенцев, резистентных к хлорамфениколу штаммов не обнаружили.

2. Жгутиковые и безжгутиковые варианты E. coli O : 111, B : 4 in vitro в течение короткого становятся резистентными по отношению к хлорамфениколу. В течение одного месяца резистентность штаммов — по сравнению с исходной — повысилась в 30—40 раз. Это свойство штаммы теряют весьма медленно.

3. Не имеется качественного различия между биохимическими свойствами чувствительных и резистентных штаммов.

4. Штаммы превращенные in vitro в резистентные подвергались характерным морфологическим изменениям. Изменялось также и поверхностное антигенное строение штаммов. Резистентные штаммы — в отношении О антигена — являются такими же раздражителями как и чувствительные, но более бедны поверхностным антигеном.

5. Движение резистентных штаммов изменилось, стало более медленным и в малой степени изменилась их чувствительность к фагу.

6. Вместе с структурными изменениями, происшедшими на поверхности штаммов, изменилась с скорость процессов катализированных дегидрогеназными энзиматическими системами. Редукционная активность резистентных штаммов, измеряемая в присутствии различных сахаров, в большой степени понижается.

7. Резистентные штаммы вырабатывают энзимоподобное вещество с помощью которого разлагают находящийся в их окружности хлорамфеникол.

VERSUCHE ZUR ISOLIERUNG VON LITHOCHOLSÄURE-ABBAUENDEM MIKROORGANISMUS*

Von

G. WIX

Forschungsinstitut für Pharmazeutische Industrie, Budapest

(Eingegangen am 8. November 1954)

Die Einführung der 11-α-Oxy-Gruppe mit Hilfe von Rhizopus-Arten in das Progesteron wurde im Jahre 1952 beschrieben [8]. Diese Entdeckung verursachte eine Revolution in der Herstellung des Cortisons. 1953 wurde mitgeteilt, dass Fusarium-Arten bei guter Ausbeute aus Progesteron Δ1,4 Androstadiendion erzeugen [21], woraus in einer Stufe Östron gewonnen werden kann. In der industriellen Produktion des Testosterons wurde die mikrobiologische Methode [6] bereits seit 1938 verwendet. Obige Mitteilungen haben das Augenmerk auf die Möglichkeiten gelenkt, welche die Mikrobiologie für die Umwandlung der Verbindungen mit Sterangerüst in der pharmazeutischen Industrie bieten kann.**

Der mikrobiologische Abbau von Verbindungen mit Sterangerüst wurde in mehreren Abhandlungen [3, 4, 5, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 20, 22] besprochen. Eine Arbeit [2] berichtet im Zusammenhang mit der Cortison-Synthese über den mikrobiologischen Abbau von Steroidsapogeninen.

Die Sicherung des Ausgangsrohmaterials zur Herstellung von Steroidhormonen ist ein schwer lösbares Problem. Es stellte sich die Frage, ob man nicht aus in der Natur vorkommenden Verbindungen mit Sterangerüst für die Hormonsynthese benötigtes Ausgangsmaterial auf mikrobiologischem Wege erhalten könne. Im Zusammenhang mit dieser weiteren Perspektive begannen wir uns mit der Isolierung von einem Gallensäure-abbauenden Mikroorganismus zu befassen.

Nach den Feststellungen von *Turfitt* [19] nimmt der Abbau des Steroidgerüstes entweder von der Seitenkette her oder bei der OH-Gruppe des A-Ringes seinen Anfang. Diesen Umstand in Rechnung stellend, erschien von den Gallensäuren die Lithocholsäure unseren Zielen am besten zu entsprechen, weil sie weniger OH-Gruppen, d. h. Angriffspunkte, enthält als die Cholsäure oder irgendeine Desoxycholsäure. Die Wahl ist auch dadurch unterstützt wor-

* Nach einem Vortrag, gehalten in der Ungarischen Mikrobiologischen Gesellschaft am 8. Oktober 1954.

** Nach Beginn unserer Versuche ist die Mitteilung (7) erschienen, wonach man, aus Progesteron ausgehend, Hydrocortison in drei mikrobiologischen Stufen erhält.

den, dass sich in den therapeutisch wichtigen Sterinen keine Hydroxylgruppen in der 7- und 12-Stellung befinden.

Bei den Stammisolierungsarbeiten hielten wir uns folgende Standpunkte vor Augen :

1. Wichtig ist, dass der Abbau von der Seitenkette her beginnen und das Sterangerüst unversehrt bleiben soll. Deswegen muss die OH-Gruppe in der 3-Stellung beschützt werden und deshalb suchten wir zum Abbau eines solchen geschützten Moleküls geeignete Organismen. Wir begannen die Versuche mit Formillithocholsäure («FL»).

2. Beim industriellen Verfahren ist vorteilhaft, wenn das zu isolierende Material im Fermentat in einer verhältnismässig hohen Konzentration anwesend ist. Wir haben also einen Mikroorganismus gesucht, der auch bei einer relativ hohen Lithocholsäurekonzentration (z. B. 0,04 Gewicht%/Volumen) funktionsfähig ist.

3. Es wurde angenommen, dass es Mikroorganismen gibt, die sich dem Molekül adaptieren können, und deswegen haben wir bei der Isolierung das Anreicherungsverfahren in einer Modifikation angewendet, wo bei den aufeinanderfolgenden Passagen die Nährböden immer mehr und mehr Lithocholsäure enthielten.

4. Wir benutzten isolierende Nährböden von verschiedenem pH. So wollten wir die Gewinnung mehrerer in Medien mit verschiedenem pH funktionsfähiger Organismen aus einem einzigen Bodenmuster gewährleisten, ausserdem haben wir auch daran gedacht, dass es bei einem industriellen Verfahren von Vorteil ist, wenn wir vom Neutralpunkt weiter entfernt arbeiten, weil in diesem Falle das Fermentat bakteriellen Verunreinigungen gegenüber nicht so empfindlich ist.

5. Wir haben demselben synthetischen Nährboden auch Fleischextrakt zugesetzt, um ebenfalls Organismen zu gewinnen, die nicht fähig sind, ihre Zelleiweisse aus anorganischen Stickstoffquellen aufzubauen.

Experimenteller Teil

Obige Gesichtspunkte berücksichtigend, wendeten wir die in Tabelle I angegebenen Nährböden [12, 18] und Versuchsaufstellung an. Von je zwei parallelen Kolben beimpften wir einen mit 1 ml von aus Gartenboden (G) bereiteter Suspension, den anderen mit 1 ml von aus Ackerboden (A) bereiteter Suspension. Wir gaben zu jedem Kolben 10 mg Formyllithocholsäure in Form von Natriumsalz (FLNa). Die beimpften Kolben wurden auf einen sich mit einer Drehzahl von 100 auf Kreisbahn bewegenden Schüttelgerüst mit 2,5 cm Exkursion gelegt ; Temperatur : 28°C. In Abständen von 3 oder 4 Tagen impften wir von jedem Kolben je 2 ml Flüssigkeitsmenge in Nährlösungen von identischer Zusammensetzung und identischem pH weiter. Im Laufe der Überimpfungen

wurde die Konzentration vom FLNa langsam erhöht. Tabelle II fasst den Isolierungsprozess zusammen.

Tabelle I

A-Lösung :
Nährboden:
1 g NH_4NO_3
0,25 g K_2HPO_4
0,25 g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$
5 mg NaCl
333 mg Fleischextrakt-Trockenstoff
(letzterer bleibt im Falle eines Fleischextrakt-freien Nährbodens weg)
mit dest. Wasser auf 1 Liter aufgefüllt

B-Lösung :
Salzmischung-Stammlösung :
485 mg $FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$
14 mg $CaCl_2$
11 mg H_3BO_3
5 mg $Co(NO_3)_2 \cdot 6\ H_2O$
0,4 mg $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$
0,04 mg $MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$
1,8 mg $(NH_4)_6Mo_7O_{27} \cdot 4\ H_2O$
8,5 mg $ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$
mit dest. Wasser auf 1 Liter aufgefüllt

Aufstellung des Versuches :

A-Lösung

ohne Fleischextrakt
in je 2 Erlenmeyerkolben von 500 ml
je 50 ml Nährlösung*

ungefähr pH 3 (G A) pH 5 (G A) pH 7 (G A) pH 9 (G A)

mit Fleischextrakt
in je 2 Erlenmeyerkolben von 500 ml
je 50 ml Nährlösung*

ungefähr pH 3 (G A) pH 5 (G A) pH 7 (G A) pH 9 (G A)

In jede Kolben gaben wir nach der Impfung je 0,5 ml sterile B-Lösung.

* Die Kolben wurden im Autoklav bei 120°C 15 Minuten lang sterilisiert.

Tabelle II

Zahl der Überimpfungen	Formillithocholsäure je Kolben in mg	Während der Überimpfungen durchgeführte Manipulationen
7	10	
1	20	Es wurde aus jedem Kolben auf 8 verschiedene Schrägagars ausgestrichen ; auf jedem Schrägagar erhielten wir Mischkulturen.
2	40	Es wurde aus jedem Kolben auf 8 verschiedene Schrägagars ausgestrichen ; auf jedem Schrägagar erhielten wir Mischkulturen.
2	100	Auf den Schrägagars sind weniger Organismen zu sehen. Aus einem Kolben erhielten wir eine Reinkultur (A 5). Auf Kartoffelagar wächst jeder (auf den übrigen Nähragars sichtbarer) Organismus.
4	400	In isolierenden Kolben wird gemessen, ob sich das pH während der Züchtung ändert (Tabelle 3). Aus der letzten Überimpfung wurde in Petrischalen auf Kartoffelagar ausgestrichen. Wir versuchten, auf Formillithocholsäure enthaltenden, mit 2% Agaragar ergänzten isolierenden Nährboden in Petrischalen auszustreichen ; auf diesen Platten vegetierten auch nach 10tägige Inkubation bei 28°C lediglich einige Organismen, welche auf den Kontrollplatten ohne Formillithocholsäure ebenfalls zu finden waren. Von den Ausstreichungen auf Kartoffelagar wurden 19 Stämme isoliert. Von diesen waren 8 identisch, so musste man insgesamt von 12 Stämmen feststellen, ob sie tatsächlich fähig sind, die Lithocholsäure anzugreifen.

Tabelle III

Änderungen des pH in der das erste 400 mg Formillithocholsäure-Natriumsalz und 50 ml Nährboden enthaltenden Kolben

Nährböden mit Fleischextrakt					Nährböden ohne Fleischextrakt				
Beim Anfang (4. 6. 1954)	Vor der Überimpfung (8. 6. 1954)				Beim Anfang (4. 6. 1954)	Vor der Überimpfung (8. 6. 1954)			
	Gartenboden		Ackerboden			Gartenboden		Ackerboden	
	Zeichen	pH	Zeichen	pH		Zeichen	pH	Zeichen	pH
3,20	FG3	4,95	FA3	5,38	3,12	G3	2,10	A3	2,10
4,92	FG5	2,93	FA5	5,62	5,15	G5	3,12	A5	3,15
7,00	FG7	5,38	FA7	5,39	6,96	G7	3,20	A7	3,80
9,19	FG9	7,23	FA9	6,34	8,58	G9	5,86	A9	3,50

Zeichenerklärung siehe Tabelle 4.

Tabelle IV

Die in der Tabelle angegebenen Ziffern bezeichnen den in Anwesenheit von FL gemessenen O_2-Verbrauch, im Prozent der Grundatmung ausgedrückt. Die Grundatmung und die in Anwesenheit von FL gemessene Atmung berechneten wir aus dem Mittelwert von je 2 parallelen Bestimmungen

O_2-Verbrauch in Anwesenheit von Formillithocholsäure			
sicher gestiegen	fraglich	nicht gestiegen	anfangs gestiegen, bei weiteren Überimpfungen nicht**
A9-1 : 286, 400	G7 : 120, 110, 110, 113	A9-2 : 92, 100	A5 : 126 A7-3 : 120
G9-1 : 195, 210, 200, 144, 284	A7-1 : 103, 107, 121	G9-3 : 104, 98, 86	525 152
G9-2 : ∞, ∞, ∞ ∞, ∞, 1280, 430, ∞, ∞ *		FG7 : 106, 90	129 250
FA3-1 : 160, 114, 110, 111, 151			106 138
FG5-3 : 276, 396			104 111
FG9 : 120, 326			97 106
			100 102
			96 96
			95 94
			104
			101

Zeichenerklärung : F : der isolierende Nährboden enthielt auch Fleischextrakt ; *G :* aus Gartenboden, *A :* aus Ackerboden bereitete Suspension, womit der erste Kolben der Serie beimpft wurde ; *Ziffer vor dem Bindestrich :* pH des isolierenden Nährbodens ; *Ziffer nach dem Bindestrich :* wievielter, aus identischem Nährboden isolierter Organismus.

* Im Falle des Zeichens ∞ war die endogene Atmung 0, im Verhältnis dazu der in Anwesenheit von FL gemessene O_2-Verbrauch unendlich.

** Die Ergebnisse sind in zeitlicher Reihenfolge angegeben. Die dieses Phänomen aufweisenden beiden Organismen sind identisch, wurden aber aus zwei verschiedenen Kulturen isoliert.

Die isolierten Stämme wurden auf dem in Tabelle I angegebenen Nährboden gezüchtet, als Kohlenquelle 2% Glukose benutzt. Die 24—96stündigen Kulturen wurden zentrifugiert, das Sediment in sterilem destilliertem Wasser zweimal gewaschen, sodann in Fleischextrakt- und Kohlenquelle-freiem Nährboden suspendiert. Von dieser Suspension wurden je 4,5 ml in 4 Warburg-Gefässe eingewogen, zu zwei Gefässchen je 0,2 ml dest. Wasser, zu zwei anderen Gefässchen je 0,2 ml einer 1 mg/ml FLNa enthaltenden Lösung gegeben ; im mittleren Gefässchen diente auf Filterpapier gemessene 0,3 ml 20%ige NaOH-Lösung zur Absorption des entstandenen Kohlendioxyds.

Die isolierten Stämme untersuchend, erhielten wir die Angaben der Tabelle IV. Wir hatten somit aus zwei Bodenmustern sechs Mikroorganismen isoliert, deren Atmung im Warburgversuch durch FL gesteigert wurde.

Die nächste Aufgabe war die genauere Untersuchung der auf Zugabe von FL mit Erhöhung des O_2-Verbrauches reagierenden Stämme. Von den sechs Stämmen führten wir zuerst mit FG5—3 eingehende Untersuchungen durch, und über diese berichten wir im Rahmen der vorliegenden Arbeit. Bevor wir die Versuche weiterführten, suchten wir statt des bisher benutzten Nährbodens, auf dem das Wachstum schwach war, ein zur Gewinnung grösserer Mengen von Mikroorganismen geeignetes Medium. Die Zusammensetzung des diesem Ziel entsprechenden Nährbodens SA5 ist :

50 g Pepton
10 g Fleischextrakt-Trockenmaterial
1,8 g Hefeextrakt-Trockenmaterial
10 g Glukose pro anal.

Nach Auffüllung mit Leitungswasser auf 1 Liter und Einstellung des pH auf 7,0 $\pm$ 0,5 wurden von diesem Nährboden je 100 ml in Erlenmeyerkolben von 500 ml eingemessen und auf die beschriebene Weise sterilisiert. In den weiteren Versuchen auf diesem Nährboden wurde der auf Schüttelgerüst gezüchtete Organismus so untersucht, dass die Kultur zentrifugiert, das Sediment zweimal mit sterilem dest. Wasser zentrifugiert gewaschen, ebenfalls in dest. Wasser suspendiert und in der folgenden Aufstellung in Warburg-Gefässe eingemessen wurde :

1,1 ml Suspension
1,4 ml mol/7,5 Puffer
0,3 ml 1 mg/ml FLNa-Lösung oder 0,3 ml dest. Wasser bei der Kontrolle, im mittleren Gefässchen 0,2 ml 20%ige NaOH-Lösung auf Filterpapier. Temperatur des Wasserbades : 28°C.

Wir untersuchten die Wirkung des pH auf die in Anwesenheit von FL gemessene Θ_2-Aufnahme (Tabelle V). Wie aus der Tabelle hervorgeht, geht die Reaktion unter den untersuchten Umständen bei pH 6,5—7,0 am schnellsten vor sich. Deswegen benutzten wir in den weiteren Versuchen stets einen Puffer von pH 6,5 und die oben angegebene Aufstellung.

Tabelle V

Wirkung des pH des Mediums auf den in Anwesenheit von FLNa gemessenen O_2-Verbrauch

Datum	Anwesenheit von FLNa	O_2-Verbrauch bei pH				
		5,12	5,50	5,86	6,47	7,07
8. 10. 1953	Kontrolle	20	17	20	24	24
	FLNa	96	83	90	120	129
12. 10. 1953	Kontrolle	—	23	82	40	38
	FLNa	86	87	92	104	153
21. 10. 1953	Kontrolle	127	116	134	141	128
	FLNa	204	201	208	246	288
22. 10. 1953	Kontrolle	67	71	98	111	114
	FLNa	128	—	178	196	199

FL haben wir lediglich zur Isolierung verwendet und im übrigen untersucht, wie die Lithocholsäure selber von dem Mikroorganismus angegriffen wird. Als folgende Stufe verglichen wir deswegen die Angreifbarkeit des Lithocholsäurenatriumsalzes (LNa) mit der des FLNa. Die Versuchsaufstellung war dieselbe wie in Tabelle V (Tabelle VI). In Anwesenheit von Lithocholsäure steigt also die O_2-Aufnahme genau so wie in Anwesenheit des Formylderivates.

Tabelle VI

Wirkung von LNa und FLNa auf den O_2-Verbrauch

Datum	Kontrolle	LNa	FLNa
26. 10. 1953	93	184	187
	98	184	192
27. 10. 1953	162	248	—
	160	254	252

Frage ist jedoch, welchem Umstand die Erhöhung der O_2-Aufnahme zuzuschreiben ist : 1. Oxydiert der Organismus die Lithocholsäure, oder 2. die Lithocholsäure wird nicht oxydiert, sondern reizt nur das Atmungssystem des Bakteriums? Um dies zu entscheiden, haben wir untersucht, wie der Stamm FG5—3 auf eine Änderung der Lithocholsäurekonzentration reagiert. Die Ergebnisse werden in Abb. 1 veranschaulicht. Erhöhen wir die Konzentration der Lithocholsäure, so steigt auch die O_2-Aufnahme an ; dies spricht für die erste Annahme, der Organismus oxydiert also das LNa. Sodann versuchten wir, diese These an Hand von präparativen Methoden nachzuweisen. Zu je 100 ml 48stündiger FG5—3 Kultur auf Nährboden SA5 wurden in Erlenmeyerkolben von 500 ml je Kolben 50 mg Lithocholsäure in Form von Natriumsalz gegeben. Zu den als stündig bezeichneten Kolben wurden nach der Zugabe sofort 10 ml Chloroform gefügt, um die Reaktion abzustellen ; die übrigen Kolben wurden hingegen für die Dauer der angegebenen Reaktionszeit auf den Schüttelgerüst zurück-

gestellt und nur nach Ablauf dieser Zeit wurde den Kolben Chloroform zugegeben. Die Ergebnisse sind in Tabelle VII dargestellt.

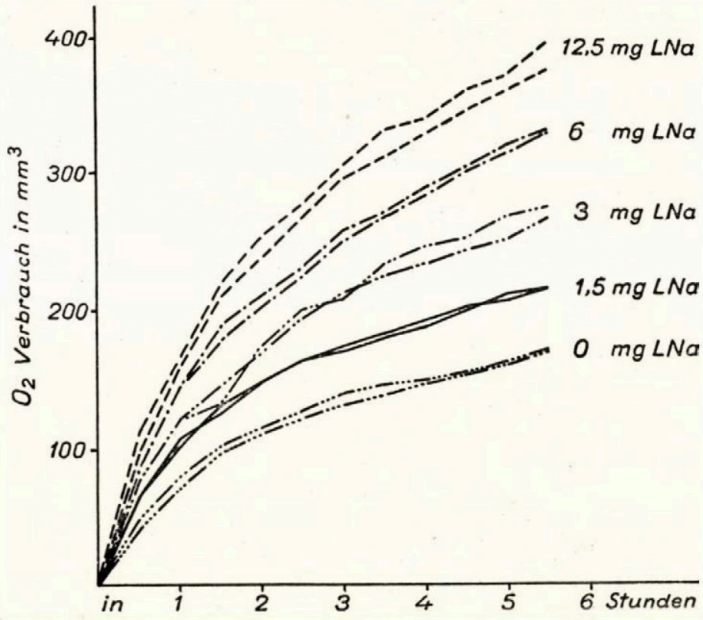


Abb. 1. O_2-Verbrauch in mm^3 in 1, 2, 3, 4, 5, 6 Stunden. Aufstellung: 2,2 ml Suspension im PO_4 Puffer von M/7,5 und pH 6,5.
Von der 5 mg/ml LNa-Lösung soviel, dass die in der Tabelle angegebenen Quantitäten in die Warburg-Gefässe gemessen werden können, die Gesamtvolumina mit dest. Wasser auf 4,7 ml ergänzt. Im mittleren Gefässchen 0,3 ml 20%iges NaOH auf Filterpapier

Tabelle VII

Präparative Versuche zum Nachweis des Lithocholsäure-Abbaues

Volumen des Fermentats in ml	Reaktionszeit in Stunden	Eingewogene Lithocholsäure in g	Extraktionsmittel in ml	Extrahiertes Material in g	Anmerkung
400	0	0,20	3 × 40, $CHCl_3$	0,205	
400	4	0,20	3 × 40, $CHCl_3$	0,119	Bei der Extraktion Verlust
400	24	0,20	4 × 40, $CHCl_3$	0,163	
500	0	0,25	3 × 40, $CHCl_3$	0,251	
500	4	0,25	3 × 40, $CHCl_3$	0,184	
500	8	0,25	3 × 40, $CHCl_3$	0,152	
500	24	0,25	3 × 40, $CHCl_3$	0,122	
1000	0	0,50	3 × 80, $CHCl_3$	0,380	Bei der Extraktion wenig Verlust
1000	4	0,50	3 × 80, $CHCl_3$	0,318	
1000	0	0,50	3 × 80, $CHCl_3$	0,30	
1000	4	0,50	3 × 80, $CHCl_3$	0,22	

Die Auspräparierungsversuche weisen darauf hin, dass der Mikroorganismus die Lithocholsäure abbaut. Frage bleibt jedoch, wie dies vor sich geht. Um das festzustellen, haben wir untersucht, was für strukturelle Eigenarten diejenigen Moleküle mit Sterangerüst aufzeigen, die von dem FG5—3 Stamm angegriffen werden. Zuerst verglichen wir das Natriumsalz des Lithocholsäure-Methyläthers mit dem LNa. Die Versuchsaufstellung war dieselbe, die wir in Tabelle V mitteilten; die Ergebnisse wurden im Teil A der Tabelle VIII dargestellt: der Mikroorganismus kann den Methyläther weniger angreifen als die Lithocholsäure selbst.

Tabelle VIII

Vergleich der Oxydierbarkeit von in wässriger und Azeton-Lösung eingeführten Substraten

Teil A. — In wässriger Lösung eingeführtes Substrat

Datum	In Anwesenheit von		
	Kontrolle	LNa	LNa-Methyläther
	gemessenes O_2 mm³/4 Stunden		
13. 4. 1954	333	566	493
15. 4. 1954	82	175	133
21. 4. 1954	258	506	305
22. 4. 1954	373	604	424
Zusammen	1046	1851	1355
Erhöhung des O_2-Verbrauches in % der Grundatmung:		177	130

Teil B. — In Azeton-Lösung eingeführtes Substrat

Datum	In Anwesenheit von			Konzentration der Bakteriensuspension*
	Kontrolle	Lithocholsäure (LS)	LS-Methyläther	
	gemessenes O_2 mm³/4 Stunden			
2. 8. 1954	198	424	245	2,0 Anteile
3. 8. 1954	354	624	507	3,5 «
4. 8. 1954	425	640	612	3,8 «
6. 8. 1954	241	435	295	2,0 «
Zusammen:	1218	2123	1659	
Erhöhung des O_2-Verbrauches in % der Grundatmung		174	136	

* Erklärung siehe Tabelle 9.

Die Untersuchung anderer struktureller Eigenarten konnte in dem bisher benutzten System nicht durchgeführt werden, weil die Mehrzahl der Verbindungen mit Sterangerüst im Wasser nicht, in sich mit Wasser vermischenden orga-

Tabelle IX

Vergleich des wässrigen und des Azeton-Atmungssystems
Versuchsaufstellung

1	2	3	4	5	6
3 ml dest. Wasser	1,4 ml dest. Wasser	1,2 ml dest. Wasser 0,2 ml LNa-Lösung (1 mg/ml freie Säure)	2,8 ml dest. Wasser 0,2 ml Azeton	1,2 ml dest. Wasser 0,2 ml Azeton	1,2 ml dest. Wasser 0,2 ml Lithocholsäure-lösung in Azeton (1 mg/ml)
	1,4 ml Bakteriensuspension im Puffer von mol/7,5 und pH 6,5. Im mittleren Gefässchen 0,2 ml 20%iges NaOH auf Filterpapier.			1,4 ml Bakteriensuspension im Puffer von mol/6,5 und pH 6,5. Im mittleren Gefässchen 0,2 ml 20%iges NaOH auf Filterpapier.	

Die in den nach Kolonne 2 und 3 gemessenen Warburg-Gefässen erhaltenen Werte wurden Barometer 1 gemäss korrigiert, die nach Kolonne 5 und 6 eingemessenen dem Barometer 4 gemäss.

Menge des verbrauchten Oxygens in mm^3, während einer vierstündigen Versuchsperiode auf eine Suspension bezogen, die je 5 ml 0,05 ml bis zur Schrumpfungskonstanz zentrifugierte Bakterienmenge enthält:

*O_2 mm^3/4 Stunden/Anteil:**

Datum	2	3	Differenz in mm^3	Differenz in %	5	6	Differenz in mm^3	Differenz in %
Ergebnisse (Mittelwert von je 2 Messungen)								
13. 5. 1954	109	171	62	57	152	256	104	69
14. 5. 1954	95	182	87	92	173	291	118	68
18. 5. 1954	87	131	44	50	87	138	51	58
Statt Azetons Äthylalkohol benutzend, erhielten wir folgende Ergebnisse								
19. 5. 1954	94	181	87	92	307	312	5	02
20. 5. 1954	106	185	79	75	449	462	13	03
21. 5. 1954	106	218	112	106	298	316	18	06

* Um eine Vergleichsbasis für die in verschiedenen Zeitpunkten durchgeführten Versuche zu besitzen, massen wir die verwendeten Bakteriensuspensionen in eine Messzentrifuge von 5 ml Volumen ein, deren untere 0,5 ml langgestreckt und in 10 Teile gleichen Volumens eingeteilt war, ein Anteil entsprach also einem Volumen von 0,05 ml. Die in den weiteren Tabellen angegebenen Resultate sind, falls es nicht besonders angezeigt ist, auf 1 Anteil/5 ml Bakteriensuspension bezogen. Der N-Gehalt einer solchen Suspension ist 32 $\pm$4 mg%.

nischen Lösungsmitteln hingegen gut lösbar ist. Wir mussten also Umstände suchen, unter welchen wir in Warburg-Gefässen, z. B. in Anwesenheit von Azeton oder Alkohol, arbeiten können, ohne dass die bedeutende Dampftension dieser Lösungsmittel bei der Untersuchungstemperatur die Ergebnisse der auf Druckveränderungen basierten Messungen fälschen würde. Wir haben dies dadurch erreicht, dass wir in das Thermobarometer ebensoviel Lösungsmittel einwogen, wie wir zusammen mit dem darin gelösten Steran zu den Bakteriumsuspension enthaltenden Gefässen gefügt haben. Wir haben verglichen, wie die in Form von Natriumsalz bzw. in Azeton eingeführte Lithocholsäure den O_2-Verbrauch des FG5—3 Stammes verändert. Die Aufstellung und die Ergebnisse des Versuches sind in Tabelle IX dargestellt. Nach Angaben der Tabelle erhält man bei dieser Aufstellung dieselben Resultate mit in Azeton gelöster Lithocholsäure wie mit der in Form von Natriumsalz in das System eingeführten. Unter ähnlichen Umständen kann Alkohol als Lösungsmittel nicht verwendet werden, da Alkohol an sich den O_2-Verbrauch derart steigert, dass die durch Lithocholsäure ausgelöste Umsatzerhöhung überdeckt wird.

Frage ist, ob in diesem System (im weiteren : Azeton-System) der FG5—3 Stamm die Lithocholsäure ebenso angreifen kann wie im wässrigen System. Vergleich der Teile A und B der Tabelle VIII zeigt, dass man, die Angreifbarkeit der Lithocholsäure und des Lithocholsäure-Methyläthers untersuchend, im wässrigen und im Azeton-System innerhalb der experimentellen Fehlergrenzen identische Ergebnisse erhält.

Tabelle X

Vergleich der Angreifbarkeit verschiedener Steranverbindungen und der Lithocholsäure. (Azeton-Methode)*

Oestron	0	Reichsteins Substanz »S«	42
Oestradiol	0	11-α-Oxyprogesteron	42
Testosteron	27	Androstendiol-Monoacetat	45
Desoxycorticosteron	32	Pregnanolon	46
Progesteron	33	Allo-Pregnanolon	47
3-keto-Lithocholsäurebisnoraldehyd	35	3-α-Acetoxy-Lithocholsäure-Bisnoraldehyd	52
Ergosterin	39	Ergosteron	58
Lithocholsäure-Methyläther	37	Cholsäure	59
Δ-1,4-Androstadiendion	40	Desoxycholsäure	68
Hyodesoxycholsäure	40	Iso-Ergosteron	70
Allo-Pregnandion	41	Cholsäuremethylester	82
		Cholesterin	101

* Die angegebenen Ziffern drücken die durch die äquimolare Menge der verschiedenen Verbindungen verursachte Erhöhung des O_2-Verbrauches im Prozentsatz der durch die Lithocholsäure verursachten Erhöhung des O_2-Verbrauches aus.

Wir verglichen mit Hilfe der Azeton-Methode die Angreifbarkeit einiger Sterinmoleküle und der Lithocholsäure (Tabelle X). Die Tabelle zeigt die auf

Lithocholsäure bezügliche Angreifbarkeit verschiedener Verbindungen. Auf Grund der Tabelle können folgende Feststellungen gemacht werden :

1. Stamm FG5—3 greift verschiedene Verbindungen mit Sterangerüst an.

2. Oestron und Oestradiol, die einen aromatischen Ring enthalten, werden von dem Stamm nicht oxydiert. Es ist eine bekannte Eigenschaft dieser Moleküle, dass sie mikrobiologischem Abbau gegenüber sehr widerstandsfähig sind [19].

3. Das Oxydationsvermögen wird scheinbar dadurch nicht beeinflusst, ob die untersuchte Verbindung zu der Cholestan- oder zu der Coprostanserie gehört.

4. Der Mikroorganismus greift auch die Verbindungen an, bei denen die Hydroxylgruppe in 3-Stellung geschützt ist (in Form von Formyl oder Methyläther). Die in der Seitenkette befindliche COOH-Gruppe ist dazu nicht notwendig, dass das Molekül angreifbar bleibe, ja der Cholsäure-Methylester ist leichter zu oxydieren als die freie Säure.

5. Verbindungen mit längerer Seitenkette sind leicht angreifbar (z. B. Cholesterin und Cholsäure-Methylester).

Die Angaben in Tabelle X können durch Annahme eines einzigen Angriffspunktes nicht erklärt werden. Ziel unserer weiteren Untersuchungen ist, festzustellen, wo die Angriffspunkte sind, an welchen der Mikroorganismus die Lithocholsäure abzubauen beginnt. Die Darstellungsweise dieser Tabelle hat sich unter anderen auch dadurch als notwendig erwiesen, dass in den verschiedenen Versuchen die bei gleichen Bakteriummengen durch Zugabe der gleichen Lithocholsäuremengen erhaltenen Erhöhungen des O_2-Verbrauches äusserst verschieden ausgefallen sind.

Weiterer Gegenstand des Versuches war, festzustellen, warum wir in den zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführten Experimenten mittels Zugabe von gleicher Lithocholsäuremenge nicht dieselbe Erhöhung des Oxygenverbrauches erhalten. Es wurde untersucht, ob das Alter der Kulturen für diese Unterschiede verantwortlich gemacht werden kann. Die Angaben in Tabelle XI haben jedoch darauf hingewiesen, dass dies nicht der Fall ist. Die Antwort erhielten wir schliesslich durch die genauere bakteriologische Untersuchung des Stammes. Den Stamm auf Kartoffelagar ausstreichend, konnten zweierlei Koloniearten beobachtet werden :

1. Glänzende runde Kolonien mit gleichmässigem Rand.

2. Weniger glänzende, ebenfalls runde Kolonien eher von fettigem Glanz, deren Rand etwas wellenartig ist.

Die den ersten Typus aufweisende Variante bezeichneten wir mit FG5—3G, die den zweiten Typus zeigende mit FG5—3M. Die Aktivität der beiden Varianten Lithocholsäure gegenüber getrennt untersuchend, erhielten wir die in Tabelle XII mitgeteilten Angaben. Die Variante mit glänzenden Kolonien oxydiert demnach kaum oder überhaupt nicht, dagegen weist die matte Kolonie ergebende

Tabelle XI

Vergleich der aus Kulturen verschiedenen Alters bereiteten Bakteriensuspensionen

O_2 mm³/mg N/Stunde

Datum	Alter der Kultur	Kontrolle (Wässriges System)	1,5 mg «LNa» (Wässriges System)	Differenz
14. 1. 1954	2tägig	57	69	12
18. 1. 1954	2 «	85	156	71
19. 1. 1954	3 «	80	116	36
20. 1. 1954	4 «	60	92	32
21. 1. 1954	2 «	84	94	10
26. 1. 1954	3 «	62	75	13
27. 1. 1954	2 «	53	100	47
28. 1. 1954	3 «	45	98	53
29. 1. 1954	4 «	6	33	27
4. 2. 1954	2 «	20	75	55

Der zur Züchtung verwendete Nährboden war SA5, die Bakteriensuspension bereiteten wir auf die in Tabelle V. beschriebene Weise.

Variante diese Eigenschaft auf. Wir trachteten also danach, in den Versuchen die FG5—3M Variante zu benutzen. Es stellte sich jedoch heraus, dass diese sehr bald glänzende Varianten bildet. Deswegen ist eine zeitweise Ausstreichung und Neuisolierung dazu erforderlich, den Stamm von unserem Gesichtspunkt aus in gutem (zur Oxydation der Lithocholsäure fähigem) Zustand zu erhalten. Mit diesem FG5—3M Stamm führten wir sodann die Identifizierungsversuche durch.

Tabelle XII

Vergleich der Aktivität der Varianten FG5—3G und FG5—3M

Datum	FG5—3G				FG5—3M			
	Grund-atmung	LNa-Atmung	Differenz		Grund-atmung	LNa-Atmung	Differenz	
	O_2 mm³/4 Stunden/Anteil		in mm³	in %	O_2 mm³/4 Stunden/Anteil		in mm³	in %
26. 4. 1954	41	48	7	17	140	258	118	84
3. 5. 1954	41	48	7	17	133	250	117	88
4. 5. 1954	37	48	11	29	176	324	148	84

Die Versuchsaufstellung ist dieselbe wie in Tabelle V.

Identifizierung des FG5—3M Stammes.

Das Nativpräparat aus zweitägiger Bouillonkultur zeigt folgendes Bild: 3—5 μ lange, 0,3—0,5 μ dicke, sich nicht bewegende Stäbchen, deren Ende

manchmal verdickt ist. Zusammenhängende sog. V -oder Y-Formen kommen häufig vor. Verzweigende Fäden sind nicht sichtbar. Die Stäbchen sind Gram-positiv, nicht säurefest. Mit Löfflerschem Methylenblau oder nach Albert gefärbt, sind innerhalb des Bakterienkörpers metachromatische Körnchen zu erkennen. In älteren (4—5tägigen) Bouillonkulturen wandeln sich die Stäbchen in kokkoide Gebilde um, welche kurze Ketten gestalten. Auch die in derselben Kette befindlichen Kokken sind von verschiedener Grösse. Der Mikroorganismus ist im allgemeinen durch Polymorphie charakterisiert.

In Bouillon wachsen die Bakterien auf der Oberfläche, in Form von kleinen ziegelroten Schuppen, die sich in der Eprouvette niedersenken und ein Sediment bilden. Inzwischen ist die Bouillon kaum getrübt.

In Schüttelkulturen (SA5 Nährboden) ist lediglich die kokkoide Form sichtbar.

Auf Kartoffelschrägagar bildet der Mikroorganismus in 4—6 Tagen eine ziemlich kompakte, matt ziegelrote Kultur von fettigem Glanz und mit steilem Rand, die sich beim Waschen in grossen Schuppen löst.

Auf Nähragar kommt ein ähnliches Bild zustande, doch ist die Farbe der Kultur matter und das Wachstum geht schneller vor sich.

Auf Asparaginagar wächst der Mikroorganismus nicht.

Auf Sabouraudschem Agar wächst er schwach.

Auf Kartoffelblock erhalten wir dasselbe Bild wie auf Kartoffelagar, doch verläuft das Wachstum langsamer.

Auf Löfflerschem Nährboden wächst der Mikroorganismus in der beschriebenen Farbe gut, verflüssigt aber nicht.

Auf Gelatine wächst er langsam und verflüssigt sehr langsam (ungefähr 3 Wochen).

Auf Kartoffelagar ausgestrichen, sehen wir runde, fettig glänzende Kulturen von 1—2 mm Durchmesser, Farbe matt ziegelrot, Rand etwas wellenartig, Oberfläche glatt.

Der Mikroorganismus wächst bei 25—28—37—40°C gut, bei 45°C kaum, bei 60°C bleibt er ½ Stunde am Leben.

Auf 0,1% Methylenblau oder 6,5% Natriumchlorid enthaltendem Nähragar Wachstum vorhanden.

Auf Milch wächst er in Form eines ziegelroten Ringes und alkalisiert schwach.

Aus Glucose, Saccharose, Maltose, Sorbose, Lactose, Galactose, Arabinose, Glycerin oder Dulcit bildet er keine Säure, nicht einmal im Peptonwasser mit Pferdeserum.

Katalase-positiv.

Reduziert kein Nitrat und bildet keinen Schwefelwasserstoff.

Indol-negativ.

Bildet keine Urease.

Auf Blutagarplatte ist keine Hämolyse zu beobachten.

Auf Grund der obigen Eigenschaften ist Stamm FG5—3 ein Corynebakterium, das mit keiner der bisher beschriebenen Corynebakterienarten identifizierbar ist [1].

Zusammenfassung

1. Mit Hilfe eines modifizierten Anreicherungsverfahrens isolierten wir aus zwei Bodenmustern 12 Organismen, von denen 6 auf Zugabe von Lithocholsäure im Warburgversuch mit Erhöhung des O_2-Verbrauches reagierten.

2. Von den 6 Stämmen untersuchten wir einen (FG5—3) eingehender und stellten fest, dass er fähig ist, Lithocholsäure anzugreifen bzw. abzubauen.

3. Wir arbeiteten eine Methode zur Untersuchung der Oxydierbarkeit der im Wasser unlöslichen Stoffe im Warburgapparat aus.

4. Mit Hilfe dieser Methode untersuchten wir, wie die strukturellen Eigenschaften der Steranverbindungen die Angreifbarkeit der Moleküle durch Stamm FG5—3 beeinflussen. Es scheint wahrscheinlich, dass dieser Mikroorganismus zum mindesten an zwei Punkten die Lithocholsäure zu oxydieren beginnt.

5. Es wurde vom Stamm FG5—3 nachgewiesen, dass er eine bisher nicht beschriebene Corynebakterienart darstellt.

*

Ich spreche Gy. Arató, Frau M. Bodánszky, J. Galántay, J. Kollonitsch, Frl. M. Rados, L. Toldy, L. Varga und T. Windholz, für verschiedene Substanzen, Frl. I. Andrássy, Frau L. Vihar, Frau F. Wiegmann und Frl. É. Wittmann für die technische Hilfe, sowie Frau M. Bodánszky, B. Kasszán und M. Bodánszky für die in Tabelle 7 mitgeteilte präparative Arbeit meinen Dank aus. Für seine Hilfe bei den Stammidentifizierungen gebührt I. Lovrekovich mein besonderer Dank.

LITERATUR

1. Bergey's Manuel of Determinative Bacteriology, 6th ed. Williams & Wilkins, Baltimore, 1948.
2. Chem. Eng. News **31,** 3550 (1953).
3. *Fried, J., Thoma, R. W., Klingsberg, A.* : J. Am. Chem. Soc. **75,** 5764 (1953).
4. *Horváth J.,, Krámli, A.* : Nature **160,** 639 (1947).
5. *Horváth, J., Krámli, A.* : Acta Biol. Hung. **18,** 19 (1948).
6. *Mamoli, L., Vercellne, A.* : Ber. dtsch. Chem. Ges. **71,** 154 (1938).
7. *Meystre, Ch., Vischer, E., Wettstein, A.* : Helv. Chim. Acta **37,** 1548 (1954).
8. *Murray, H. C., Peterson, D. H.* : USP 2,602.769 (July 8, 1952).
9. *Peterson, D. H.* et al. : J. Am. Chem. Soc. **75,** 5768 (1953).
10. *Sauter, M., Ajl, S. J., Turner, R. A.* : J. biol. Chem. **198,** 397 (1952).
11. *Sauter, M., Ajl, S. J.* : J. biol. Chem. **199,** 85 (1952).
12. *Schatz, A., Savard, K., Pintner, I. J.* : J. Bact. **58,** 117 (1949).

13. *Schiesser, Alma:* Ricerca sci. **23,** 638 (1953).
14. *Sobel, H., Plaut, A.:* J. Bact. **57,** 377 (1949).
15. *Tak, J. D.:* J. Microbiol. Serol. **8,** 32 (1942).
16. *Talalay, P., Dobson, M. M., Tapley, D. F.:* Nature **170,** 620 (1952).
17. *Turfitt, G. E.:* J. Bact. **47,** 487 (1944).
18. *Turfitt, G. E.:* Biochem. J. **38,** 492 (1944).
19. *Turfitt, G. E.:* Biochem. J. **42,** 376 (1948).
20. *Verona, O., Cipriani, P.:* Riv. Ist. Sieroter. Ital. **26,** 151 (1951).
21. *Vischer, E., Wettstein, A.:* Experientia **9,** 371 (1953).
22. *Wainfan, R., Marx, W., Heukin, G., Rittenberg, S. C.:* 123rd Meeting of the Am. Chem. Soc., Los Angeles, March 15—19, 1953.

ЭКСПЕРИМЕНТЫ ПО ВЫДЕЛЕНИЮ МИКРООРГАНИЗМОВ, РАЗЛАГАЮЩИХ ЛИТОКОЛОВУЮ КИСЛОТУ

Дь. Викс

Р е з ю м е

Автор модифицированным обогатительным методом изолировал из двух проб почв 12 микроорганизмов, из которых 6 — в опыте Варбурга — реагировали на добавление литоколовой кислоты повышенным потреблением O_2.

Из шести штаммов один (FG5 – 3) исследовал более подробно и определил, что он способен поражать и разлагать литоколовую кислоту.

Разработал метод исследования с помощью аппарата Варбурга окисляемости не растворяющихся в воде веществ.

С помощью данного метода автор исследовал поражение штаммом FG 5—3 соединений стерана с различнымн структурнымн особенностямн. Оказалось вероятным, что данный штамм начинает окислять литоколовую кислоту по крайней мере в двух точках.

Автор доказал, что штамм FG 5 – 3 является одним, до сих пор еще не описанным видом бактерии Корине.

VIRUS NEUTRALISATION EXPERIMENTS WITH LYMPHOID CELL- AND LYMPH NODE-EXTRACTS

By

J. SINKOVICS

State Institute of Public Health, Budapest

(Received November 24, 1954)

For long the physiological function of the lymphoid cells remained unknown, except that they are produced and kept in circulation in an enormous number and that they are renewed several times a day. There were, however, early pathohistological data suggesting that these cells might be involved in some way in the fight of the organism against infection, since in certain pathological conditions they were found in increased numbers at the affected sites. At the same time, there were no data to indicate that lymphocytes would be capable of phagocytosing large corpuscular elements, such as bacteria. Early clinical experience revealed also that there was a direct relationship between the serum globulin level and the plasmocyte count, or the development of plasmocytic tumours [1, 2, 3]. In spite of the wealth of data accumulated on this subject it was only in the past decade that experimental immunology became concerned with the role presumably played by lymphocytes and plasma cells in the fight of the organism against infection.

Before all, it was shown that in the regional lymph node of the area to which an antigenic stimulus is applied great amounts of antibodies to different antigens are produced within a short period of time (4—10). Comparing the antibody contents of the inflowing and outflowing lymph, it was usually the latter that contained considerably more antibody [11]. These observations, however, fit equally well into the reticuloendothelial theory of antibody production, the reticular cells of lymph nodes being important members of that system. For this reason has the observation been considered significant that extracts prepared from cellular elements of the outflowing lymph contain more antibody than the lymph or the blood serum [12]. Another observation of fundamental importance was that tissue cultures of splenic red pulp also showed antibody production [13]. Such tissue cultures contain mainly plasmocytes, but it cannot be ignored that also other (reticuloendothelial) cell constituents are present in them. It was also demonstrated that on the surface of lymphocytes from immunised animals bacteria of the species used for immunisation become specifically agglutinated [14, 15]. Other experiments revealed that the capability to produce antibody could be trans-

ferred into non-immunised mice with malignant lymphocytic tumours of immunised mice [16]. There is ample experimental evidence showing that reagins or other immune bodies can be transferred passively with lymphocytes [17—20]. It is possible that lymphocytes contain also normal globulins, as it has been found that the serum of rabbits immunised with purified human gammaglobulin precipitated the extract of washed lymphocytes from a human cadaver [21]. Pathohistological and histochemical studies of lymph nodes producing antibodies when exposed to antigenic stimuli have shown that, as early as in the first few days following application of the antigenic stimulus, enormous numbers of immature lymph cells, such as lymphoblasts and plasmoblasts appear in them, and that, due to accumulation of ribonucleic acid, the cytoplasm of these cells is basophilic or pyroninophilic, it being known that accumulation in the cytoplasm of ribonucleic acids is a sign of intense protein synthesis. The antibody level in lymph node extracts reaches its maximum at the same time as, or somewhat later than, the appearance of these cytological and histochemical changes [22—24]. Experiments *in vivo* and *in vitro* have been carried out with the purpose of excluding the possibility that lymph cells leaving the lymph node adsorb the antibody on their surface only. These experiments revealed that normal lymphocytes mixed to lymph containing antibody do not fix antibodies and that lymphocytes from a living lymph node into which antibodies have been injected a few hours previously contain no antibody [25]. Finally, endocrinological examinations have shown that the extent of the lymphatic system is regulated by an adreno-cortical steroid hormone oxidised at the 11th carbon atom. This hormone induces a decrease in the volume of lymphatic tissue and an excessive disintegration of lymphocytes. The proteins released from the cytoplasm of disintegrating lymphocytes enter the blood serum ; as determined by electrophoretic studies, they belong to the group of serum globulins. In the animal with normal adrenals the adrenocorticotropic hormone (ACTH) of the pituitary gland may also bring about these changes in the lymphoid cells (26—28). On the basis of the above observations, the majority of researchers in this field have arrived at the conclusion that antibodies are produced by lymphoid cells.

Some authors, however, have failed to reproduce even the fundamental experiments, as far as they were unable to demonstrate that the regional lymph node of the site at which the antigenic stimulus has been applied, or the extract prepared from the cellular elements of the lymph flowing from this node, contains more antibody than the lymph fluid or the blood, or that such extracts contain antibodies at all [29, 30]. In other experiments no antibody could be detected by serological and immune-chemical methods in the extract of lymphocytes from the peripheral circulation (from blood or from the thoracic duct) of immunised animals [9, 31, 32]. When given intravenously, influenza virus causes a marked lymphopenia in the rabbit ; in the immunised rabbit, however, this lymphopenia is not followed by an increase of the level of antibodies in

blood [53]. Moreover, it has been reported recently that no anamnestic reaction could be induced in immunised animals by treatment with adrenal cortical extracts or ACTH [34—36].

The great number of generally accepted experimental data confirming the capability of the reticuloendothelial system to produce antibodies, has only increased the confusion [37—41]. The authors accepting the view that lymphoid cells are actually capable of producing antibodies argue that in the reticuloendothelial system only a transformation and breakdown of antigens takes place in order to render them accessible for the lymphoid cells [42, 43]. One of these theories claims that there are three stages in antibody production, (i) transformation of antigen in the reticuloendothelial system ; (ii) production of antibodies in the lymphoid cells ; and (iii) storage of antibodies in the lymphoid cells [43].

Attempts have been made also to demonstrate that the negative results obtained in some experiments concerned with antibody production in lymphocytes would be due to errors in the dosage of antigen, to the fact that less resistant lymphocytes were injured in the course of repeated washing, and to the uncertainty with which the regional lymph node can be identified [44]. Apart from a few cases, however, there is no reason to regard the control experiments less reliable than the original ones.

There are also some conspicuous deficiencies in the pertaining literature. For instance, the capability of lymphoid cells to produce antibody to viruses has been studied in insufficient detail only, although early observations [4, 6] had already indicated that such investigations would yield valuable evidence, and also, that it is just the viral diseases that are characterized by a so-called roundcell infiltration at the affected site. Apart from a limited number of experiments carried out in this field [29, 45], most workers devoted their attention to studies involving the use of killed bacteria or of sheep erythrocytes as antigens. Moreover, practically all the conclusions drawn were based on results obtained in a single system, evaluating the antibody response of the popliteal lymph node to antigens inoculated into the foot pad of the rabbit. Finally, no consideration has been given to evolutional factors, although it is well known that, in the course of both the phylo- and ontogenesis, — lymphocytic activity starts earlier than the production of specific antibodies.

Our own experiments in this field had been started in 1951 and attempts were made to control all the deficiencies which we thought were detectable in earlier experimental works. The central object of our investigations was the production of antibody in the regional lymph node of the mouse lung after intranasal inoculation of living virus.

Materials and methods

Virus strains. The strains used in the experiments were the PR8 strain of the influenza virus type A (from *H. von Magnus*, Copenhagen) ; a strain of vaccinia virus in calf lymph (from

Dr. J. Szathmáry, Phylaxia), adapted by us to chick embryo chorio-allantoic membrane , a tick born encephalitis virus strain isolated in this country and designated as KEm_1 [46]; a Newcastle disease (ND) virus strain isolated in this country from a human subject with oculoglandular illness, designated as SE strain [47]; a lymphocytic choriomeningitis (LCM) virus strain, designated as KJ and isolated also in this country [48].

Harvesting of lymphoid cells from the thoracic duct and abdominal exudate of rabbits. Rabbits immunised (subcutaneously and intravenously) with large doses of living influenza virus 5 to 6 times within one month were used. Lymphoid cells were collected by two methods : 1. The chest was opened, artificial breathing started, the thoracic duct was cannulated and the lymph was slowly aspirated into a tuberculin syringe containing physiological citrate solution. 2. Immunised animals had been injected with 2 ml of steril paraffine oil intraperitoneally. 24 hours later the animal was killed by exsanguination, its abdominal cavity was washed with physiological citrate solution. Hen leucocytes were obtained by the latter method.

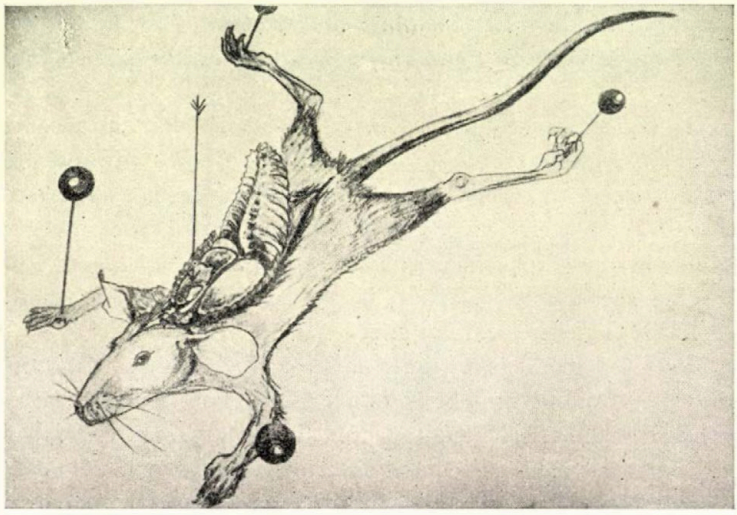


Fig. 1. Regional (retromediastinal) lymph node of the mouse lung on the right side behind the trachea

Preparation of lymphoid cell extracts. The cells were washed three times with 0,95 per cent chilled physiological saline in a centrifuge placed into a refrigerator and smears were made from the last sediment. The cell constituents of the peritoneal exudate were in 50 per cent small leucocytes with round nuclei (lymphoid cells), the rest consisting of erythrocytes, a few peritoneal epithelial cells, polymorphonuclear leucocytes and not easily identifiable immature cells. The cellular sediment obtained from the thoracic duct consisted almost exclusively of lymphocytes, but a few plasma cells were also visible. The cytoplasm of the lymphoid cells was not affected by the above treatment. Cellular extracts from animals belonging to the same group were pooled. The cellular sediment was frozen and thawed 15 times ; approximately 0,1 ml of cellular sediment was extracted with 0,5 ml of physiological sodium chloride solution.

Estimation of antibody in regional lymph nodes. Mice develop pneumonia after being inoculated intranasally with the above mentioned viruses under light general anaesthesia. At the same time the regional lymph node of the lung increases to even ten times the original size. This lymph node is located in the retromediastinum (Fig. 1) and adheres to the right side of the trachea and to the posterior chest wall [6]. The weight of the normal lymph node hardly attains 2—4 mg ; 3 to 4 days after intranasal inoculation of certain viruses its weight may exceed 10 to 20 mg. In our experiments 25 or more mice were inoculated with the same living virus material and after killing the animals by bleeding on the 3rd or 4th day following inoculation the retromediastinal lymph node was removed. The lymph nodes were pooled, homogenized with quartzpowder, and extracted in most cases with physiological saline at the dilution of 1 to 5. After centrifuging the supernatant was inactivated in a water bath of 56° C for 30 minutes. The

precipitate formed was centrifuged off and the opalescent supernatant was used in the virus neutralization tests.

Chorio-allantoic membrane tissue cultures. Chorio-allantoic membranes removed from 13 to 14-day old chick embryos were several times washed and finely minced. A loopful of minced membrane was added to 2 ml of Simms' solution. Cultures inoculated with influenza or ND virus were shaken several times during the first hours of incubation ; otherwise this incubation was carried out vithout rotation the cultures. After two days of incubation, the haemagglutination (HA) titre of the supernatants was usually in the range of 1 : 16 to 1 : 32 ; the same influenza virus material has proved to be about 100 times more infective in the allantoic sac of the embryonated chick egg than in the surviving minced chorio-allantoic membrane.

Virus neutralisation tests. These tests were made in various tissue elements, by two methods. 1. To the virus material diluted in tenfold steps, equal volumes of extract or serum were added and the mixtures were maintained for 1 to 2 hours at room temperature or in an incubator or in a refrigerator. With each dilution 4 mice were inoculated by the method most favourable for viral growth. 2. To the lymph extract or blood serum, diluted in three- to fourfold steps (1:2, 1: 8, 1 : 32, *etc.)*, were added equal volumes of a known amount of living virus material and the mixtures were incubated for an adequate length of time. With each dilution 4 to 8 mice or tissue cultures were inoculated. The rate of viral growth was estimated on the basis of typical death of the animals, or on grounds of the haemagglutinating capacity of the lung homogenizates specific for influenza virus, or on that of the haemagglutination shown by the supernatant of tissue cultures. In the case of vaccinia virus, virus neutralisation was estimated on the basis of the reduction in the number of foci formed on the chorio-allantoic membrane of the embryonated egg. LD50 and ID50 values were expressed by a statistical method [49].

Complement fixation tests. These were carried out only for lymphocytic choriomeningitis materials, using *Takátsy's* micro loop-dilution method [64]. Frozen and thawed spleen homogenisate from mice inoculated intraperitoneally with virus served as antigen. Immune serum was produced in guinea pigs.

Histological examinations. Pulmonary regional (retromediastinal) lymph nodes from non-inoculated, broth-inoculated and virus-inoculated mice, respectively, were examined in impression preparations stained according to Giemsa, in sections stained with haematoxylin-eosin, or with methylgreen-pyronine. Inguinal lymph nodes from newborn rabbits inoculated with virus at the interior aspect of the thigh were also examined.

Experimental

Virus neutralising capacity of peripherial lymphoid cell extracts. — In the first part of the experiments extracts prepared from cellular constituents of the peripherial lymph of rabbits immunised with large doses of influenza virus were

Table I

Virus neutralising capacity of lymphoid cell extracts from hyperimmunised animals, as compared to that of serum

Experiment No.	Immunisation data			Virus used in neutralisation test	Neutralisation index of pooled sera or of extracts		
	Animal	Number of test animals	Virus		Serum	Exudate cellextract	Lymphocytic extract
1.	rabbit	3	—	PR 8	1	1	—
	rabbit	7	PR 8	PR 8	> 30 000	87	—
2.	rabbit	2	—	PR 8	17	—	1
	rabbit	4	PR 8	PR 8	280 000	—	52
3.	hen	5	PR 8	PR 8	360 000	72	—

Exudate cell extract : cells were gained from paraffin oil pretreated peritoneal cavity.
Lymphocytic extract : cells were gained from thoracic duct.

tested for virus neutralising power [50]. In Table I is shown that the blood serum and extracts from non-immunised animals contained no antibodies neutralising influenza virus. On the other hand, the blood serum of immunised animals had a high influenza virus neutralisation titer ; lymphocytic extracts from the same animals showed very low antibody levels in comparison with their serum ; the neutralisation index was only slightly above the appreciable value.

Production of antibody to intranasally inoculated virus in the regional lymph node of the mouse lung. — In the second part of the experiments, the regional lymph node of the mouse lung was examined for production of antibody to various

Table II

Virus neutralising capacity of the regional (retromediastinal) lymph node of the mouse lung on the 3rd or 4th day after intranasal infection, as compared to that of serum
(Titrations in chorio-allantoic membrane cultures)

Experiment No.	Virus inoculated intranasally	Virus used in neutralisation test and its dose (ID 50)		50 per cent neutralisation titres for		Product of neutralisation titres and virus doses	
				Serum	Lymph node extract	Serum	Extract
1.	PR8	PR8	32	1 : 4	1 : 70	128	2240
2.	PR8	PR8	20	1 : 5	1 : 80	100	1600
	—	PR8	20	<1 : 4	<1 : 20	<80	<400
3.	PR8	PR8	20	1 : 2	1 : 80	40	1600
4.	PR8	PR8	57	1 : 4	1 : 60	228	3420
5.	ND	ND	7	1 : 2	1 : 75	14	525
6.	ND	ND	7	<1 : 2	1 : 87	<14	609
7.	ND	PR8	15	—	<1 : 20	—	<300
	PR8	ND	7	—	<1 : 20	—	<140

living viruses. In Table II is shown that the extract of lymph nodes removed 3 to 4 days after intranasal infection contained more antibody than the serum examined at the same time. This is particularly striking in the case of ND virus, which, as well known, does not grow in the mouse lung, in spite of the fact that it causes grave lesions in that organ [51—53]. It may also be seen in Table II that the lymph node extracts did not give cross-neutralisation between influenza and ND viruses.

Table III

Virus neutralising capacity of the regional (retromediastinal) lymph node of the mouse lung during the first days following intranasal inoculation
(Titrations in mice and in chick embryos.)

Experiment No.	Virus	Number of days after inoculation	Site of neutralisation test	Neutralisation index	
				Serum	Lymph node extract
1.	PR8	4	mouse lung	4	100
2.	PR8	3	mouse lung	3	60
3.	PR8	5	mouse lung	128	1056
4.	PR8	4	mouse lung	15	470
5.	Vaccinia	3	chorio-allantoic membrane	2	80
6.	Vaccinia	3	chorio-allantoic membrane	7	60
7.	LCM «KJ»	4	mouse brain	2	3
8.	LCM «KJ»	4	mouse brain	1	2
9.	LCM «KJ»	7	mouse brain	1	1
10.	KEm_1	4	mouse brain	4	32

According to the data in Table III, too, in the extract of lymph nodes removed during the first week following infection the level of antibody was higher than in the serum of the same animals, though in these cases antibody titration was performed either in mouse lung, or on the living chorio-allantoic membrane of the embryonated egg. It is, however, conspicuous that the virus neutralisation titres as determined by the mouse lung method are lower than those obtained in tests involving the use of surviving chorio-allantoic membrane cultures. Illustrative of this is experiment 4 in Tables II and III which shows the virus neutralisation titer of the serum and the lymph node extract of the same animal to influenza virus as determined on minced chorio-allantoic membrane and in the mouse lung, respectively. This phenomenon is obviously related to the finding that influenza virus grows less readily in surviving minced chorio-allantoic membranes, so that favourable conditions are created for antibody-effects.

The most striking observation was that the regional lymph node of the lungs of mice inoculated intranasally with LCM virus *did not contain* virus neutralising antibody. The single experiment carried out with KEm_1 virus is presented only for the sake of completeness.

In the following, blood and lymph node extracts from mice inoculated intranasally with LCM virus were examined for complement fixing antibodies. The results of both the cold tests (made in a refrigerator) and the warm ones (in a 37 C° water bath) were negative.

Antibody production in the regional lymph node of the mouse lung inoculated simultaneously with LCM and influenza viruses. — Attempts were made to elucidate whether the mouse lymph node inoculated with LCM virus could produce immune bodies against the influenza virus. In preliminary tests it had to be determined whether the LCM virus inoculated into the mouse lung would not suppress by interference the growth of the influenza virus. Influenza virus was found to grow equally well in mouse lungs inoculated with broth and with LCM virus (Table IV).

Table IV

Interference experiments between LCM and influenza viruses in the mouse lung

HA titres for pools of lung homogenisates using 4 mice for each pool. Mice inoculated with	
Broth and PR8 virus	LCM «KJ» and PR8 viruses
640	1280
40	1280
1280	640
80	20
1280	640
Mean 664	772

The figures are the reciprocals of titer dilutions.

Other informative examinations were carried out to determine whether the two viruses would reach the regional (retromediastinal) lymph node if given intranasally, and if so, how long would they survive in that organ. As regards the influenza virus, it was found that on the second day after pulmonary infection the regional lymph nodes were infective at dilutions as high as 10^{-2} to 10^{-3}, while by the 6th inoculation day after they contained no infective virus. In early experiments the active lymph node extracts prepared soon after infection were found to have an unusually low and irregular virus neutralisation capacity. For this reason, inactivated extracts were subsequently employed for virus neutralisation tests in which the antibody content of the lymph node could exert its action without being previously exhausted.

LCM virus was also demonstrated in ample quantities in the retromediastinal lymph nodes of mice inoculated intranasally, even in case of mixed infection with influenza virus, at a time when the amount of influenza virus was declining due to antibody action (Table V).

Table V

Virus content of retromediastinal lymph nodes of mice inoculated intranasally with influenza or LCM virus

Virus inoculated intranasally	Number of days after infection	Lymph node extract dilutions	Death of mice inoculated	
			intranasally	intracerebrally*
PR8	2	10^{-3}	5/5	—
PR8	6	$10^{-1,3}$	0/5	—
LCM «KJ»	2 1/2	10^{-3}	—	3/5
LCM «KJ»	6	10^{-3}	—	3/5
LCM + PR8	3	$10^{-1,3}$	1/4	5/5
LCM + PR8	3	$10^{-2,3}$	1/5	5/5

The denominator represents the number of inoculated, the numerator that of infected mice.

* The intracerebrally inoculated and died mice exhibiting symptoms typical of LCM. The lung homogenisate from mice that succumbed after intranasal inoculation agglutinated erythrocytes.

Table VI

Influenza virus neutralising capacity of extracts prepared from regional lymph nodes of the lung of mice inoculated simultaneously with LCM and influenza viruses
(Titrations in chorio-allantoic membrane cultures.)

Experiment No.	Intranasally inoculated virus	Virus used in neutralisation test and its dose (ID_{50})	50 per cent neutralisation titre of lymph node extract	Product of dose of virus and neutralisation titre
1.	LCM + PR8	PR8 15	1 : 90	1350
	— PR8	PR8 15	1 : 75	1125
2.	LCM + PR8	PR8 15	1 : 102	1530
	— PR8	PR8 15	1 : 90	1350

According to the data in Table VI, the regional lymph node of the mouse lung inoculated with both viruses was capable of producing anti-influenza antibodies, in spite of the simultaneous presence of LCM virus. At the same time we were unable to demonstrate the production or presence of antibodies neutralising the virus of LCM (Table VII).

Attempts to show antibody production in lymph nodes of newborn animals. — Regional lymph nodes of newborn animals were also examined for antibody production and for lymphocytic reactions against the virus of influenza. Baby chickens and newborn guinea pigs produced certain amounts of antibody, while newborn rabbits did not. Newborn rabbits were inoculated at the interior aspect of one thigh and after killing the animals a few days later by bleeding, the serum,

Table VII

Attempts to neutralise the LCM virus by retromediastinal lymph node extracts from mice inoculated intranasally with a mixture of LCM and PR8 viruses

Experiment No.	Dilutions of LCM virus	LCM virus + LCM—PR8 lymph node extract	LCM virus + immune guinea pig serum	LCM virus + normal serum
1.	$10^{-1,8}$	4/4	0/5	5/5
2.	$10^{-3,6}$	5/5	0/4	3/4

Denominator: Number of mice inoculated.
Numerator: Number of mice succumbed.

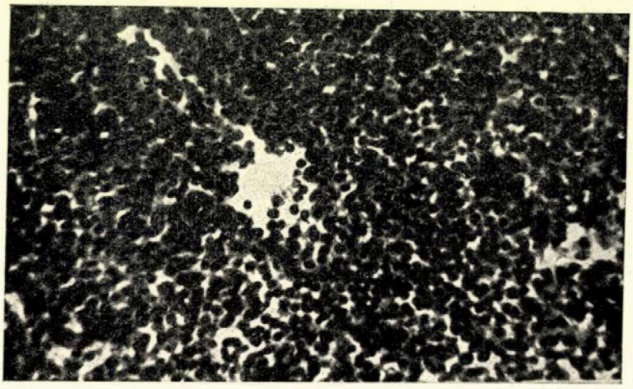


Fig. 2. Histological section of normal regional (retromediastinal) lymph node of the mouse lung. Regular formation of lymphocytes. Haematoxylin-eosin staining, x 250

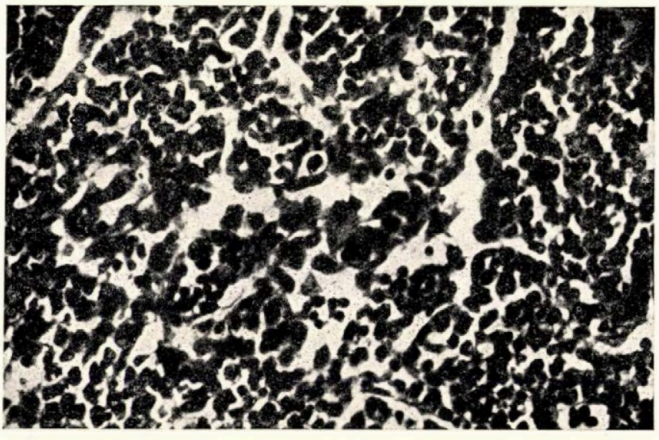


Fig. 3. Histological section of regional (retromediastinal) lymph node of mouse lung inoculated with influenza virus, 4 days after infection. Loosened structure, enhanced lymphoid cell formation, proliferation of reticulum cells. Haematoxylin-eosin staining, x 250

as well as the extracts made of the inguinal and presacral lymph nodes were examined for presence of virus neutralising antibodies. The results were perfectly negative ; at the same time, histology revealed a marked lymphoid cell reaction

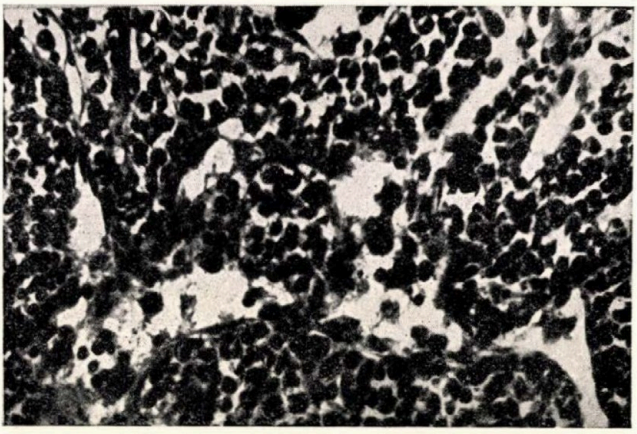


Fig. 4. Histological section of regional (retromediastinal) lymph node of mouse lung inoculated with lymphocytic choriomeningitis virus, 4 days after infection. Oedema, masses of immature lymphoid cells, proliferation of reticulum cells. Haematoxylin eosin staining x 250

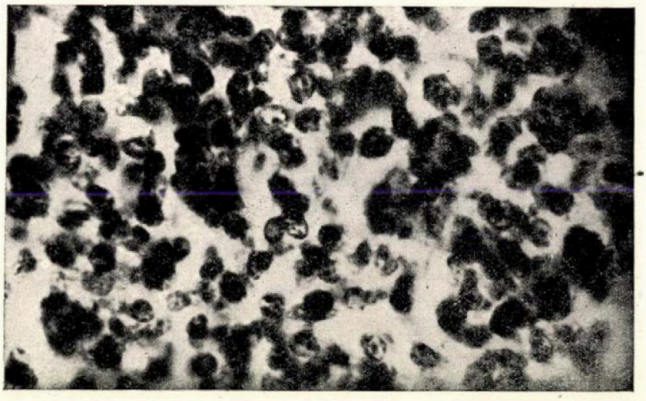


Fig. 5. Normal regional (retromediastinal) lymph node of mouse lung. Moderate staining of cell nuclei and cytoplasm ; mature lymphoid cells preponderate. Methylgreen-pyronine staining x 630

in the lymph nodes, but also in those lymph nodes which were on the side opposite the inoculated one.

Histological examinations. — Retromediastinal lymph nodes from mice infected with influenza virus and with the virus of LCM respectively, were examined histologically. The histological patterns did not differ qualitatively in the two types of infection. In both cases the characteristic changes were as follows. Immature lymphoid cells, such as lymphoblasts and plasmoblasts, were present

in increased numbers, as compared with the regular production of lymph cells in the non-inoculated lymph node (Figs. 2, 3, 4). The structure of infected lymph nodes showed loosening and later proliferation of reticuloendothelial cells; subsequently formation of oedema and of microscopic haemorrhages were

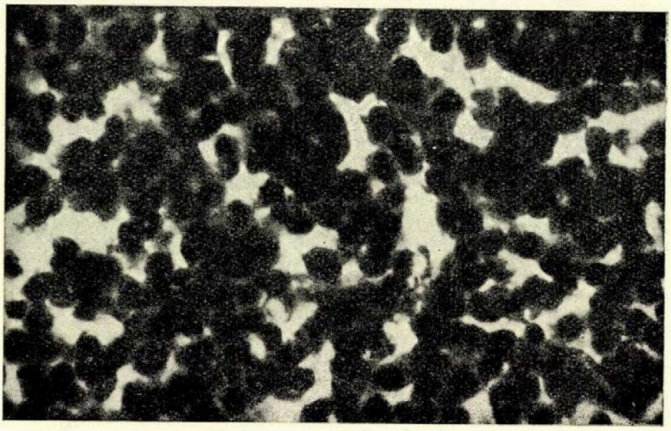


Fig. 6. Regional (retromediastinal) lymph node of mouse lung inoculated with influenza virus, 4 days after infection. Firmly stained cell nuclei and cytoplasm; immature lymphoid cells preponderate. Methylgreen-pyronine staining, x 630

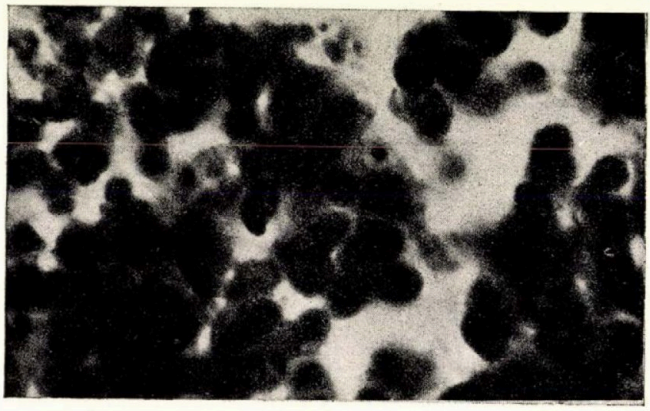


Fig. 7. Regional (retromediastinal) lymph node of mouse lung inoculated with lymphocytic choriomeningitis virus, 4 days after infection. Firmly stained cell nuclei and cytoplasm; almost exclusively immature lymphoid cells. Methylgreen-pyronine staining, x 630

marked. In methylgreen-pyronine treated sections the cell nuclei in the normal lymph node stained with methylgreen while the cytoplasm took up hardly any pyronine. In contrast to this, in the lymph nodes infected either with LCM virus or with influenza virus the cytoplasm of the immature lymphoid cells were most intensively pyroninophilic and cell nuclei accumulated large amounts of methylgreen (Figs. 5, 6, 7).

Discussion

Our first observation is that in later stages of strong immunisation the lymphocytes on their way toward the periphery may contain antibody, but considerably less than there is in the serum. In contrast to this, in the early stages of an infection or immunisation, considerably more antibody is present centrally, in the regional lymph node of the site to which the antigenic stimulus had been applied, than in the blood. It cannot, however, be stated with certainty which kind of cell in the lymph node is responsible for antibody production. The arguments put forward to support the view that lymphoid cells do produce antibodies, viz. the rapid increase in the number of immature lymphoid cells and the accumulation in the cytoplasm of these cells of ribonucleic acids, lose their validity in the light of our observations made in connection with the virus of LCM. It has been shown that an extensive lymphoid cell reaction and the pyroninophilia are *no specific signs* indicative of antibody production ; both may be namely present in lymph nodes infected with LCM virus, even in the absence of antibody production.

It would, however, be very important to find the explanation of this phenomenon. There is just one similar immune-biological phenomenon known, the one described under the term of «immunologic paralysis» [54] : mice inoculated with massive doses of purified pneumococcal capsular substance do not produce antibody to polysaccharides belonging to the same type as the one inoculated, due to the blockade of antibody-producing cells ; at the same time, antibody to other types of polysaccharides may be produced. The similarity between this phenomenon and what we have observed with the virus of LCM is obvious, inasmuch as in the latter case immune bodies were produced against the virus of influenza. The difference between the two phenomena is seen in the fact that the virus of LCM causes a marked increase in the production of lymphoid cells. The latter action of the virus of LCM is sometimes so intensive that it has been suspected to be involved in the genesis of malignant lymphocytic tumours so frequently developing in mice carrying virus for protracted periods [55].

In the light of the above mentioned observations it may be assumed that the LCM virus enhances lymphocytopoesis at the expense of certain protein synthesis, i. e. it inhibits, first of all, the production of *specific* antibodies. On the other hand, this would imply that those cells are most involved in antibody production which are the precursors of lymphoid cells. To our present knowledge, lymphocytes and plasmocytes originate ultimately from reticulum cells, which are important members of the reticuloendothelial system.

It appears that while with mice it is the rule that no antibodies are produced against the virus of LCM [56, 57], in man this occurs only occasionally. Not every one of the sera of patients convalescing from lymphocytic choriomeningitis, confirmed by virus isolation in Hungary, contained demonstrable virus

neutralising antibodies [48, 58]. There are also other viruses to which the mouse consequently fails to produce antibodies. Such, for instance, is the virus of lymphogranuloma inguinale [59] which has been classified since long into the group of reticuloendotheliotropic viruses. In some cases certain viruses (for instance the swine plague or hog cholera virus) could be isolated from lymph nodes for periods as long as 3 weeks despite the presence of antibodies [60].

The studies in which newborn animals were examined with respect to the evolution of antibody production, permitted only of the conclusion that there appears to be a stage in ontogenesis during which antibody is, not yet produced but intensive lymphoid cell activity already occurs. The activity in the lymph node contralateral to the site of inoculation may be explained by assuming that the development of the whole lymphatic system is reactive in nature and starts immediately after birth, in response to various exogenous infections [61].

It is beyond doubt that even phylogenetically the lymphocytic response is more ancient than the production of specific antibodies. The normal differential leucocyte count in the haemolymph of worms or insects comprises 38 to 45 per cent lymphocytes and 50 to 57 per cent leucocytes [62, 63]. The inoculation of *Mycobacterium tuberculosis typus avium* increases the proportion of lymphocytes to above 80 per cent within 12 hours, while other white cells fall to 11 per cent [63]. The pattern is, therefore characterised by a lymphocytic response ; these lymphocytes, however, are capable of phagocytosis. At the same time, specific immune body production is still absent on this stage of phylogenesis. In conclusion, it appears that the lymphocytic reaction is a more ancient onto- and phylogenetical defensive response than is the production of specific antibodies.

Accordingly, at present only the following theory has a firm experimental basis. The site of antibody production is in the cells of the reticuloendothelial system, in the reticulum cells of the lymph nodes. When these cells divide, the antibodies are transferred into the cytoplasm of immature lymphoid cells, where their synthesis may eventually continue for a short period of time, and it is from there that they are released into the lymph and the blood, or are carried by the lymphoid cells directly to the site of infection.

Summary

Experimental evidence is presented to show that the regional lymph node of the mouse lung is capable of producing at a high rate antibodies to various viruses inoculated intranasally, except to the virus of lymphocytic choriomeningitis. Histology, however, reveals that, following infection with the latter virus, the number of lymphoblasts and plasmoblasts also increases and that the cytoplasm of these cells contains increased amounts of ribonucleic acid, which has been thought to be related to the production of immune proteins.

Thus, in spite of the fact that the virus of lymphocytic choriomeningitis exerts a stimulating action on lymphocytopoesis, no production of antibody to this virus could be demonstrated in the mouse lymph node. At the same time this lymph node — overwhelmed by the lymphocytic choriomeningitis virus — is capable of producing antibodies against the influenza virus. It may be assumed that the virus of lymphocytic choriomeningitis by *invading* the reticulum cells of the lymph node induces an increased formation of immature lymphoid cells and inhibits the production of *specific* antibodies.

Acknowledgements

Author expresses his thanks to Dr. E. Molnár for advice and assistance in the experimental work, to Professor Dr. I. Sümegi, Dr. M. Gaál and Dr. M. Raditz for kind supervision of the histological material.

LITERATURE

1. *Bing, J., Plum, P.:* Acta Med. Scand. **92,** 547 (1937).
2. *Undritz, E.:* Helvet. Med. Acta **5,** 548 (1938).
3. *Baló, J.:* Kórbonctan. Szikra. Budapest, 1948. I. p. 30.
4. *McMaster, P. D., Hudack, S. S.:* J. Exp. Med. **61,** 783 (1935).
5. *McMaster, P. D., Kidd, J. G.:* J. Exp. Med. **66,** 73 (1937).
6. *Burnet, F. M., Lush, D.:* Austral J. Exp. Med. Sci. **16,** 261 (1938).
7. *Ehrich, W. E., Harris, T. N.:* J. Exp. Med. **76,** 335 (1942).
8. *Dougherty, T. F., Chase, J. H., White, A.:* Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. **57,** 295 (1944).
9. *Азлецкая—Мациевская Н. Е.*, cit..: Зилбер, Л. А.: Основы иммунитета. Москва, Медгиз, стр. 319 (1948).
10. *Oakley, C. L., Warrack, G. H., Batty, I.:* J. Path. Bact. **61,** 179 (1949).
11. *Ehrich, W. E., Harris, T. N., Mertens, E.:* J. Exp. Med. **83,** 373 (1946).
12. *Harris, T. N., Grimm, E., Mertens, E., Ehrich, W. E.:* J. Exp. Med. **81,** 73 (1945).
13. *Fagraeus, A.:* Antibody Production in Relation to the Development of Plasma Cells. Stockholm. 1948; — J. Immunol. **58,** 1 (1948).
14. *Reiss, E., Mertens, E., Ehrich, W. E.:* Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. **74,** 732 (1950).
15. *Hayes, S. P., Dougherty, T. F.:* J. Immunol. **73,** 95 (1954).
16. *Dougherty, T. F., Chase, J. H., White, A.:* Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. **59,** 172 (1945).
17. *Chase, M. W.:* Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. **59,** 134 (1945).
18. *Kirchheimer, W. F., Weiser, R. S., Van Liew, R.:* Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. **70,** 99 (1949).
19. *Sherwood, Lawrence, H.:* Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. **71,** 516 (1949).
20. *Harris, S., Harris, T. N.:* J. Exp. Med. **100,** 269 (1954).
21. *Kass, E. H.:* Science **101,** 337 (1945).
22. *Harris, T. N., Harris, S.:* Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. **69,** 18 (1948).
23. *Harris, T. N., Harris, S.:* J. Exp. Med. **90,** 169 (1949).
24. *Ehrich, W. E., Drabkin, D. L., Forman, C.:* J. Exp. Med. **90,** 157 (1949).
25. *Ehrich, W. E.:* Ann. N. Y. Acad. Sci. **46,** 823 (1946).
26. *Dougherty, T. F., White, A., Chase, J. H.:* Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. **56,** 28 (1944).
27. *Dougherty, T. F., Chase, J. H., White, A.:* Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. **58,** 135 (1945).
28. *White, A., Dougherty, T. F.:* Ann. N. Y. Acad. Sci. **46,** 859 (1946).
29. *Soloviev, V. D., Gaidamovich, S. Y.:* Am. Rev. Soviet Med. **4,** 226 (1946).
30. *Habel, K., Endicott, K. M., Bell, J. F., Spear, F.:* J. Immunol. **61,** 131 (1949).
31. *Craddock, C. G., Valentine, W. N., Lawrence, J. S.:* J. Lab. & Clin. Med. **34,** 158 (1949).
32. *Erslev, A.:* J. Immunol. **67,** 281 (1951).
33. *Harris, S., Henle, W.:* J. Immunol. **59,** 9 (1948).
34. *Eisen, H. N., Mayer, M. M., Moore, D. H., Tarr, R., Stoerk, H. C.:* Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. **65,** 301 (1947).
35. *Fischel, E. E., LeMay, M., Kabat, E. A.:* J. Immunol. **61,** 89 (1949).
36. *De Vries, J. A.:* J. Immunol., **65,** 1 (1950).
37. *Howell, K. M., Tower, L. E.:* Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. **23,** 759 (1926).

38. *Cannon, P. R., Baer, R. S., Sullivan, F. L., Webster, J. R.:* J. Immunol. **17,** 441 (1929).
39. *Jancsó, M.:* Klin. Wchnschr., 537 (1931).
40. *Tuft, L.:* J. Immunol., **27,** 63 (1934).
41. *Berta, L., Sinkovics, J.:* Orvosi Hetilap **90,** 143 (1949).
42. *Harris, T. N., Ehrich, W. E.:* J. Exp. Med. **84,** 157 (1946).
43. *Chun Chang, Chi-Luen Sze:* Chinese Med. J. **70,** 87 (1952).
44. *Harris, T. N., Harris, S.:* J. Immunol. **64,** 45 (1950).
45. *Harris, S., Harris, T. N.:* J. Immunol. **61,** 193 (1949).
46. *Fornosi, F., Molnár, E.:* Orvosi Hetilap **93,** 993 (1952); — **95,** 144 (1954); — Acta Microbiol. Hung., **1,** 9. (1954.)
47. *Sinkovics, J.:* Kísérletes Orvostudomány **1,** 134 (1949).
48. *Molnár, E.:* Orvosi Hetilap **94, 8,** 208 (1953).
49. *Reed, L. J., Muench, H.:* Am. J. Hyg. **27,** 493 (1938).
50. *Sinkovics, J., Markos, Gy.:* Unpublished observations.
51. *Sinkovics, J.:* Magyar Állatorvosok Lapja **23—24** (1949).
52. *Ginsberg, H. S.:* J. Exp. Med. **94,** 191 (1951).
53. *Davenport, F. M.:* J. Immunol. **69,** 461 (1952).
54. *Felton, L. D.:* J. Immunol. **61,** 107 (1949).
55. *Traub, E.:* Hdbuch d. Viruskrankheiten. Hgb.: Gildemeister, E., Haagen, E. Waldman, O., Jena. 1939. II. p. 360.
56. *Traub, E.:* J. Exp. Med. **69,** 801 (1939).
57. *Haas, V. H.:* J. Infect. Dis., **94,** 187 (1954).
58. *Koch, S., Pintér, M., Ivánovics, Gy.:* Orvosi Hetilap **91,** 865 (1950).
59. *Grabar, P., Schoen, R.:* Bull. Soc. Chim. Biol. **23,** 281, 291 (1941).
60. *Manninger, R., Csontos, J.:* Arch. Tierheilk., **65,** 108 (1932).
61. *Policard, A.:* Précis d'histologie physiologique. Doin & Cie, Paris 1950, p. 403.
62. *Metalnikov, S.:* Ztschr. Exp. Med. **84,** 89 (1932).
63. *Cameron, G.:* J. Path. Bact. **38,** 441 (1934).
64. *Takátsy, Gy.:* Kísérletes Orvostudomány **4,** 60 (1953).

ЭКСПЕРИМЕНТЫ ПО НЕЙТРАЛИЗАЦИИ ВИРУСОВ ЭКСТРАКТАМИ ЛИМФАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК И УЗЛОВ

Й. Шинкович

Р е з ю м е

Путем известных в настоящее время методов исследования возможно убедиться в наличии антител в лимфатических клетках, но еще до сих пор не удалось доказать, образуют ли эти клетки антитела.

Мы определили, что мытые лимфатические клетки гипериммунизированных кроликов содержат вируснейтрализующие противотела, но — по сравнению с кровяной сывороткой — в очень малом количестве. В противоположность этому региональный лимфатический узел легких мышей, на 3—4 день после внутриносового введения гриппозного вируса, содержит значительно больше вируснейтрализующих антител, чем кровяная сыворотка тех же животных. Подобное положение имеется в случае внутриносового введения вирусов Vaccinia и Newcastle. Образование антител в лимфатических узлах сопровождается накоплением незрелых плазматических клеток и лимфобластов с высоким содержанием рибонуклеиновой кислоты. Исходя из этого можно было бы предположить, что антитела производятся этими клетками, однако такие же патогистологические изменения наблюдаются и в случае внутриносового введения вируса лимфоцитарного хориоменингита также и без образования антител.

На основании вышеизложенного можно заключить, что вирус лимфоцитарного хориоменингита оказывает особенное возбуждающее действие на образование лимфатических клеток и одновременно тормозит иные синтезы белков (например специфическое образование антител). Мышиный лимфатический узел, наполненный вирусом лимфоцитарного хориоменингита, однако одновременно вырабатывает антитела против вируса гриппа, что указывает на специфичность этого торможения.

Таким образом — по нашим современными знаниям — достоверно подтверждается экспериментами то предположение, что противотела вырабатываются клетками ретикуло-эндотелиальной системы, в лимфатических узлах — ретикулярными клетками, при делении клеток противотела проникают в плазму незрелых и зрелых лимфатических клеток и отсюда попадают в лимфу и в кровь, или переносятся лимфатическими клетками непосредственно к месту заражения.

IMMUNITY IN SUBJECTS RECOVERED FROM DYSENTERY

By

K. RAUSS and I. KÉTYI

Institute of Microbiology, University Medical School, Pécs

(Received November 26, 1954)

The serological multiplicity of Shigellae explains why it is difficult to decide on the ground of literature whether immunity to dysentery exists and, if yes, what its duration is. The problem also effects vaccination ; if there is no immunity, specific prevention cannot be effective either.

Epidemiological observations suggest a short duration of immunity [1—3]. Epidemiological examinations supported by bacteriological research also indicate development of immunity, presumably of short duration [2, 4]. *Cooper* and *Keller* [5] were the first to report that blood sera of dysentery convalescents have high mouse protective titres. This finding has been confirmed by others [6, 7], and promised the possibility that immunity may be studied by laboratory methods. It has not been examined, however, whether the mouse protective titre can be considered a true representative of immunity, and the duration of immunity has not been determined either. These considerations have induced us to carry out the investigations described in this paper. The behaviour of protective titre was studied during and after the period of convalescence, aimed at obtaining answers to the above questions.

Material and Methods

Samples of serum from bacteriologically confirmed Shigella flexneri and sonnei epidemics, as well as from individual cases were examined. From epidemics, 15 to 40 samples of blood could be obtained by courtesy of Dr. I. Fürész, Head of the Department of Bacteriology of the State Hygienic Institute, Dr. J. Szita, scientific researcher of the same institute, and J. Hajnik, epidemiologist in County Baranya. The sera so obtained were pooled and the pools were subjected to tests. There were at least 3 samplings ; one at the anticipated peak of immunity, about the end of the first month following onset of the disease ; another six months, and a third one year later. Between acquisition of samples and actual tests 2 months to 2 years elapsed. Until tested, the sera were stored at + 2° C after treatment with merthiolate (1 in 10 000). Our research was aimed at demonstrating agglutinins and mouse protective antibodies in the sera.

The tests for *agglutinins* were carried out in 0,5 ml volume, diluted serially from 1 in 10, using as antigen formolized suspensions of the type causing infection.

Mouse protection tests. Selected strains of Shigellae were grown in 1 per cent Bacto-peptone-water and incubated for 6 hours. From this culture, in the phase of active growth, dilutions were made and suspended in 5 per cent mucine. These suspensions served as infecting doses which contained 0,4 ml of mucine and 0,1 ml of diluted culture in 0,5 ml volume, per dose. The type of Shigella used for infection was the same that had been isolated from the patient or the epidemic.

The suspensions were inoculated intraperitoneally into mice immunized with 0,01 ml of test serum 30 minutes earlier, using the intraperitoneal route. The observation period lasted 72 hours. Each infective dose was inoculated into 4 mice. From the incidence of death in the group infected, but not immunized, the dilution of the peptone water culture killing 50 per cent of the test animals was calculated according to *Reed* and *Muench* [8] (LD50). The degree of protection was estimated on the basis of the number of LD50 infective doses against which 0,01 ml serum gave protection. The values are, of course, relative, and are suitable for comparison only if the samples from one individual or from the same epidemic are worked up within the same experiment. Each sample was tested 3 or 4 times with corresponding results. The data in the Tables represent the results of the final experiment, in which sera from epidemics or patients affected by the same Shigella type were tested for protective action within the same experiment. This was done in order to allow a comparison of the protective potency of sera of different origin.

Results

Agglutinin titres of sera. Blood samples tested 3 to 4 weeks following infection usually showed low titres. Most of them agglutinated in the range from 1 : 40 to 1 : 80, while titres as high as 1 : 160 or 1 : 320 were only infrequently encountered. 6 months after onset of the disease mostly no agglutinin titre was demonstrable, only a few sera yielded titres in the range of 1 : 20 to 1 : 40. After another 6 months the situation was unchanged. It is therefore probable that agglutination at dilutions of 1 : 20 to 1 : 40 represented the normal titres.

Mouse protective potency of sera. Sera from 3 epidemics and 2 individual infections with *Shigella flexneri* were tested for protective titres. The pathogenic agent was *Shigella flexneri* type 2*a* in two of the epidemics and in two individuals, while in the third epidemic it was type 3.

The detailed results are shown in Tables I and II ; the cumulative data are presented in Table III.

It is seen in Table III that by the end of the first month following infection, the mouse protection titres were higher than those of sera taken at later points of time. In the former sera the titres varied between 1000 and 400 LD50. Four to seven months later the protective value is already reduced and by the end of the first year it is quite low, as compared to the initial level.

In Fig. 1 are illustrated the changes in protective titre in the serum of patient K. I., who had repeatedly contracted the same type of infection. The new infection caused an increase in protective titre, which had fallen practically to 0 within a year.

In Tables II, and IV are shown the protective values of sera from subjects who had recovered from *Shigella sonnei* infection. The blood samples originated from 8 to 10 years old children infected during an epidemic, as well as from a carefully studied patient. The pattern of changes in protective potency closely resembled that observed in *Shigella flexneri* infections (Table IV). As soon as 2 weeks after the outbreak the titres were already high, only to fall to practically 0 in the next 20 months. Data of another patient are even more demonstrative. In this case a sample of serum taken two weeks before onset

Table I

Mouse protective titre of sera of subjects with previous dysentery caused by S. flexneri type 2a.

Infective doses ml	Control animals	Mice immunized with 0,01 ml serum. Designation of sera and months elapsed since infection										
		Epidemic in M.		Epidemic in V.			U. G.			K. I.		
		1	14	1	7	14	1	5	14	1	5	12
10^{-2}	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0
10^{-3}	4/0	4/2	4/0	4/1	4/0	4/0	4/1	4/0	4/0	4/2	4/0	4/0
10^{-4}	4/0	4/4	4/0	4/3	4/2	4/1	4/3	4/2	4/0	4/3	4/2	4/0
10^{-5}	4/1	4/4	4/2	4/4	4/4	4/1	4/3	4/4	4/1	4/4	4/4	4/0
10^{-6}	4/2	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
10^{-7}	4/3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
LD50	10^{-6}	10^{-3}	10^{-5}	$5 \cdot 10^{-4}$	10^{-4}	$8{,}5 \cdot 10^{-6}$	$4 \cdot 10^{-4}$	10^{-4}	$7{,}5 \cdot 10^{-6}$	$8 \cdot 10^{-4}$	10^{-4}	$5 \cdot 10^{-6}$

Numerator: number of mice inoculated.
Denominator: number of survivors.

Table II

Mouse protective titres of sera of subjects with previous dysentery

Infective doses ml	Types causing infection											
	S. flexneri 3				S. sonnei							
	Control animals	Designation of sera and months elapsed since infection			Control animals	Designation of sera and months elapsed since infection						
		Epidemic in L.				Epidemic in Bp.			V. Z.			
		1	8	13		1/2	1	20	0	1/2	3	6
10^{-2}	4/0	4/0	4/0	4/0	.	.	.	.	.	.	.	.
10^{-3}	4/0	4/0	4/0	4/0	.	.	.	.	.	.	.	.
10^{-4}	4/0	4/2	4/0	4/0	.	4/0	4/0	4/0	4/0	4/1	4/0	4/0
10^{-5}	4/0	4/4	4/3	4/1	.	4/2	4/2	4/0	4/0	4/2	4/0	4/0
10^{-6}	4/1	4/4	4/4	4/4	.	4/3	4/4	4/0	4/1	4/3	4/2	4/0
10^{-7}	4/3	.	.	.	4/0	4/4	4/4	4/0	4/2	4/4	4/3	4/2
10^{-8}	4/4	.	.	.	4/1	4/4	4/4	4/1	4/4	4/4	4/4	4/4
10^{-9}	.	.	.	.	4/3	.	.	.	.	.	.	.
10^{-10}	.	.	.	.	4/4	.	.	.	.	.	.	.
LD50	$5 \cdot 10^{-7}$	10^{-4}	$2{,}5 \cdot 10^{-5}$	$7{,}5 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-9}$	$7{,}5 \cdot 10^{-6}$	10^{-5}	$4 \cdot 10^{-5}$	$2{,}5 \cdot 10^{-7}$	10^{-5}	$8 \cdot 10^{-7}$	10^{-7}

Numerator: number of mice inoculated.
Denominator: number of survivors.

was also available. The initial protective titre rose to an extreme height within 2 weeks after the infection, but 3 months later it was already markedly diminished and 6 months later it was found at the initial level.

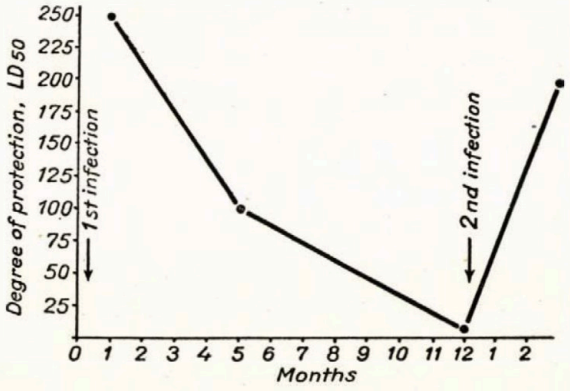


Fig. 1. Changes in protective titre in the serum of patient K. J.

Table III

Homologous immunity after S. flexneri infection, as determined by passive mouse protection tests

Type	Designation of serum	Protection of mice inoculated with 0,01 ml of serum (Protection indexes)		
		Months elapsed since infection		
		1	5—8	12—14
2. a	M. epidemic	1000	.	10
	V. epidemic	500	100	8,5
	U. G.	400	100	7,5
	K. J.	800	100	5
3.	L. epidemic	500	125	37,5

Table IV

Homologous immunity after S. sonnei infection, as determined by passive mouse protection tests

Designation of serum	Protection of mice inoculated with 0,01 ml of serum (Protection indexes)					
	Time elapsed since infection					
	Before infection	2 weeks	4 weeks	3 months	6 months	20 months
Epidemic in BP.	.	3750	5000	.	.	5
V. Z.	125	5000	.	400	50	.

Discussion

The results suggest no parallelism between agglutination and mouse protection titres. It has been shown namely that sera taken during the 4th week of disease were highly protective, irrespective of the low (1 : 40) or high (1 : 320) titre of test sera. Sera examined 6 months later showed 0 or normal agglutination titres, but still possessed protective antibodies. These facts are in agreement with earlier observations [5, 7] and appear to indicate that the humoral factor responsible for the mouse protective test may be separated from agglutinins.

Of the question raised in the introduction we wish to answer first the one considering the relationship between mouse protecting antibodies and human immunity. Data of the subject recovered from *Shigella sonnei* infection supply part of the answer. If the protective value observed before infection is taken as normal protective titre (and it is highly possible that this is entirely justified), then it might be assumed that 6 months after the infection the titre, which was almost identical with the former one, represents normal protective titre again. It may be concluded from this that changes in protection titre in the intermediate period (increase after infection, considerable diminution after 3 months) are actually indicative of immunity.

There is a further point indicating that the variations in mouse protection titre might reflect changes in human immunity. We have had occasion to follow the course of the protection titre curve of a subject who had repeatedly contracted infection with the same type of *Shigella flexneri*. After the first infection the course of the curve was similar to that described above ; one year later hardly any protection was detectable. Shortly after the last sampling a new infection occurred, followed by an increase in protection titre. The connection between disappearance of protection titre and cessation of immunity, on the one hand, and on the other between re-infection and increase in protection titre was so obvious as to make it highly probable that the mouse protection titre actually indicates human immunity. Although experimental evidence points into this direction, the relation of immunity and mouse protecting antibodies cannot be established with certainty without studying mouse protecting antibodies in the serum of patients suffering from chronic dysentery. It is assumed namely that chronic dysentery is due to lack of immunity.

In the light of the above experiments the second question, concerning the duration of immunity, may be answered as follows.

Dysenteric infection induces a high level of immunity, which, however, disappears within 1/2 or 1 year. The duration of immunity to *Shigella sonnei* appears to be shorter than that to *Shigella flexneri*. From all this it follows that not more than a few months of immunity may be expected from active immunisation.

Summary

(i) Mouse protective antibodies may be considered as indicators of immunity to dysentery and as such can be used in studies on the duration of immunity.

(ii) Four weeks following infection with *S. flexneri* and *sonnei* high mouse protection titres could be demonstrated. These disappeared 6 months after infections with *S. sonnei*, and 1 year after infection with *S. flexneri*.

(iii) No relationship could be demonstrated between the agglutination titre and the mouse protecting capacity of sera.

(iv) To corroborate the conclusions concerning the immunity-indicating rôle of mouse protecting antibodies, immunity in chronic dysentery should be investigated by the mouse protecting method.

LITERATURE

1. *Felsen, J.:* Bacillary Dysentery, Saunders Philadelphia, 1945.
2. *Hardy, A. V., Chant, H. I.:* Publ. Health. Rep. **57,** 1079 (1942).
3. *Barnes, L. A., Bennet, I. L., Gordon, R. S.:* Naval Med. Bull. **49,** 757 (1949).
4. *Arbona, G., Gonzalez, L.:* Am. Jour. Publ. Health. **39,** 195 (1949).
5. *Cooper, M. L., Keller, H. M.:* Jour. Immunol. **58,** 357 (1948).
6. *Barnes, L. A., Cooper, M. L., Jerome, E. A., Durant, R. C., Smith, A. B.:* Jour. Immunol. **66,** 515 (1951).
7. *Rauss, K., Kétyi, I.:* Acta Physiol. Hung. **3,** 619 (1952).
8. *Reed, L. C., Muench, H.:* Am. Jour. Hyg. **27,** 493 (1930).

ИЗУЧЕНИЕ ИММУНИТЕТА ЛЮДЕЙ ПЕРЕБОЛЕВШИХ ДИЗЕНТЕРИЕЙ

К. Рауши и *И. Кетьи*

Резюме

Настоящая работа имела цель исследовать вырабатывается ли иммунитет после перенесенной дизентерии и определить длительность этого иммунитета. В процессе исследования были анализированы сыворотки происходящие из эпидемических случаев вызванных тремя штаммами S. flexneri типа 2. а, одним штаммом S. flexneri типа 3. и одним штаммом S. sonnei, а также сыворотки взятые от трех индивидов. Исследовательский материал в каждом случае был собран на четвертой неделе после заболевания, а затем на 6 и 12 месяцев позже. Сыворотками иммунизировали мышей внутрибрюшинно дозой в 1,01 мл, затем заражали взвешенными в муцине культурами. Заражение производили штаммом соответствующим вызванному болезнь типу.

Сыворотки взятые на 4-ой неделе после заражения выявляли высокую защитную ценность для мышей. Полгода спустя защитная способность выраженно снижалась и через год совершенно прекращалась. Защитный титр для мышей сыворотки одного индивида, зараженного вторично идентичным типом S. flexneri, в момент заражения был равен нулю, но под действием заражения снова повысился.

Таким образом на основании защитных титров для мышей можно сделать вывод, что после перенесенной дизентерии развивается иммунитет, который — в случае заражения штаммом S. flexneri — прекращается спустя 1 год, а — в случае заражения штаммом S. sonnei — спустя полгода. Однако имеется необходимость дальнейшего изучения соотношения между антителами защитными для мышей и иммунитетом. С этой целью авторы желают производить исследование больных хронической формой дизентерии.

EXPERIMENTELLE STUDIEN ÜBER DIE GEMEINSAME ANWENDUNG VON ANTITUBERKULOTISCHEN MITTELN

II. TIEREXPERIMENTE

Von

I. KOCZKA

Mikrobiologisches Institut der Medizinischen Universität, Szeged

(Eingegangen am 27 November 1954)

In einer vorangegangenen Mitteilung [1] besprachen wir unsere in vitro Experimente mit Isonikotinsäurehydrazid (INH), Streptomycin, para-Aminosalicylsäure (PAS) und para-Acetylamino-benzaldehyd-thiosemicarbazon (Tb_1), sowie mit einigen Kombinationen dieser Mittel. Wir wiesen nach, dass bei der Untersuchung der gemeinsamen Wirkung dieser Mittel nicht nur Summierung zu beobachten ist, sondern auch das Erscheinen resistenter Bazillen seltener wird oder überhaupt ausbleibt.

In diesem Teil unserer Arbeit haben wir die therapeutische Wirkung der bereits erwähnten vier Mittel und ihrer möglichen Kombinationen an Mäusen verglichen.

Material und Methoden

Bei unseren Experimenten verwandten wir folgende Verbindungen: kristallinisches Isonikotinsäurehydrazid-Chlorhydrat, Dihydrostreptomycinsulphat, para-Aminosalicylsäure (Tebaminal Chinoin), para-Acetylamino-benzaldehydthiosemicarbazon (Thiomicid).*

Wir benützten semmelfarbige Mäuse beiden Geschlechts von unserer Zucht, deren Gewicht zwischen 21 und 25 g schwankte.

Die Tiere wurden *intravenös* mit einer Suspension des *Ravenel*stammes *(M. tuberculosis typ. bovinus)* infiziert, die Bazillen von 0,5 ml Volumen und 0,05 mg Trockengewicht enthielt. Die zur gleichen Zeit infizierten Tiere teilten wir am Tage nach der Infektion in Gruppen von je zehn Mäusen, und zwar in der Weise, dass in einen bestimmten Käfig stets Mäuse des selben Geschlechts gelangten. Am gleichen Tage begannen wir auch, die einzelnen Gruppen mit den Mitteln zu behandeln.

Streptomycin und INH injizierten wir in einer sterilen Lösung von 0,5 ml, täglich einmal *subkutan*, während PAS und Tb_1 den Tieren — sorgfältig mit dem Futter vermischt — peroral verabreicht wurden. Zur Lösung der Mittel verwandten wir M/15 Phosphatpuffer ($pH = 7{,}1$). Die mit den Mitteln vermischte Nahrung konnte von den Tieren in beliebiger Menge verzehrt werden. Unserer Beobachtung nach war die tägliche Nahrungs-, d. h. Heilmittelaufnahme der Mäuse gleichmässig. Während der Experiment war die Nahrung der Tiere eiweissarm; wir bereiteten diese auf die Weise zu, dass wir 300 g feingeschrotete Gerste, 300 g geschroteten Mais, 2 g Kochsalz, 2 g Kalziumkarbonat, 200 ml Milch und 800 ml Wasser zu einem Brei kochten. Der Flüssigkeitsbedarf der Mäuse wurde durch die derart zubereitete Nahrung befriedigt.

Die medikamentöse Behandlung dauerte 14 Tage und über ihren Erfolg informierten wir uns mittels Bestimmung der durchschnittlichen Lebensdauer der zu den einzelnen Gruppen gehörenden Mäuse nach der Infektion. Da wir früher nachgewiesen hatten, dass im Falle der in unseren Experimenten angewandten Methoden die Häufigkeit des Verendens der gleichförmig infizierten Tiere der normalen Verteilung folgt [3], benützten wir zu der, mit 95%iger Sicherheit erfolgenden Bestimmung der durchschnittlichen Lebensdauer und ihres Fehlers *Litchfields* [2] graphische Methode.

* Diese Verbindungen wurden von dem Forschungsinstitut für Pharmakologische Industrie zur Verfügung gestellt, wofür wir an dieser Stelle unseren Dank aussprechen.

Ergebnisse

Die Ergebnisse unserer Experimente sind in Tab. I zusammengefasst, in der wir die durchschnittliche Lebensdauer der zu den einzelnen Gruppen gehörenden Mäuse nach der Infektion, sowie deren wahrscheinlichen Fehler angeführt haben.

Tabelle I

Therapeutische Wirkung von Heilmittelkombinationen auf die experimentelle Tuberkulose von Mäusen
10 Mäuse pro Gruppe. Dauer der Behandlung: 14 Tage

Heilmittelbehandlung pro Maus und Tag	Durchschnittliche Lebensdauer der Mäuse mit 95%iger Wahrscheinlichkeit
Kontrolle	18,5 (20—17)
0,02 mg INH subkutan	18,5 (20—17)
0,01% Thiomicid peroral	19,0 (24—15)
0,5% PAS p. o.	20,5 (23—18)
0,2 mg Streptomycin subk.	22,0 (23—21)
INH + PAS	22,0 (23—21)
Thiomicid + PAS	23,0 (25—20)
INH + Streptomycin	23,3 (24—23)
PAS + Streptomycin	24,5 (26—23)
Thiomicid + Streptomycin	29,0 (33—25)
Thiomicid + INH	30,0 (33—27)
INH + PAS + Streptomycin	25,5 (26—25)
Thiomicid + PAS + Streptomycin	29,0 (32—26)
INH + Thiomicid + PAS	31,0 (36—27)
INH + Thiomicid + Streptomycin	31,0 (32—29)
INH + Thiomicid + PAS + Streptomycin	28,0 (29—27)
2,0 mg Streptomycin subk.	36,0 (40—32)
0,08 mg INH subk.	37,0 (48—28)
0,05% Thiomicid peroral	31,0 (38—24)

Die Mengen der einzelnen Mittel wählten wir auf Grund unserer Vorexperimente in der Weise, dass diese allein die durchschnittliche Lebensdauer der Mäuse — den unbehandelten Kontrollen gegenüber — nicht wesentlich verändern sollten. Bei Behandlung mit Kombinationen änderte sich die Menge der einzelnen Medikamente nicht.

Wir konnten beobachten, dass peroral dargereichte PAS oder Tb_1 die Lebensdauer der Mäuse tatsächlich nicht beeinflusste, jedoch die Streuung der einzelnen Fälle erhöhte. Die verhältnismässig grosse Streuung war für Tb_1

charakteristisch und kann auf die wechselnde Empfindlichkeit der im übrigen, aus der gleichen Zucht stammenden Mäuse Tb_1 gegenüber zurückgeführt werden. Das Ausmass der Streuung der mit Thiomicid behandelten Gruppe wurde weder durch die gleichzeitige Gabe anderer Mittel, noch durch eine Steigerung der Quantität des Tb_1 vermindert.

Die auf Wirkung der bei unserem Experiment benützten PAS-Quantität zu beobachtende grössere Streuung zeigte im Falle einer Kombinierung mit INH oder Streptomycin eine wesentliche Verringerung.

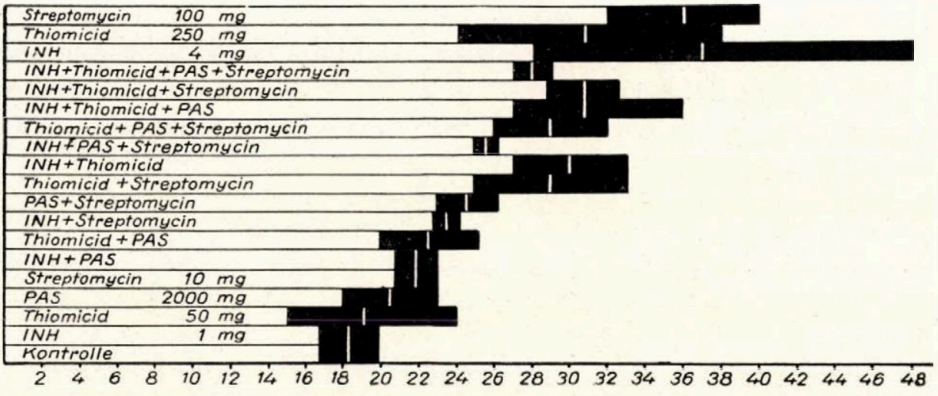


Abb. 1. Wirkung von Heilmittelkombinationen auf die Lebensdauer von mit Tuberkelbazillen infizierten Mäusen. Lebensdauer der Mäuse nach der Infektion, in Tagen. *Bemerkung:* Die dunklen Felder veranschaulichen den wahrscheinlichen Fehler des Durchschnitts. Die angeführten Heilmittelmengen sind pro Tag und pro Kilogramm Körpergewicht zu verstehen

Das subkutane Injizieren von INH oder Streptomycin beeinflusste die Regelmässigkeit des Verendens der Mäuse nicht. Eine therapeutische Wirkung besass lediglich das Streptomycin, da sich die durchschnittliche Lebensdauer der Mäuse wesentlich von dem der Kontrollgruppen unterschied. Die in unserem Experiment angewandte INH-Menge war an sich auf die durchschnittliche Lebensdauer der Mäuse wirkungslos.

Zur Veranschaulichung der Wirkung der Heilmittelkombinationen bringen wir Abb. 1.

Mit Ausnahme der Thiomicid enthaltenden Kombinationen verringerte sich daher im Falle der gleichzeitigen Anwendung mehrerer Medikamente nicht nur die Streuung der einzelnen Fälle, sondern es nahm auch die Lebensdauer der Mäusegruppen zu. Obwohl jede Heilmittelkombination den zahlmässigen Wert der durchschnittlichen Lebensdauer gegenüber den, nur mit den einzelnen Heilmitteln behandelten Gruppen erhöhte, konnten wir im Falle von

Zweierkombinationen mit Bestimmtheit einen wesentlichen Unterschied nur bei Behandlung mit *Thiomicid* + *Streptomycin*, sowie mit *Thiomicid* + *INH* beobachten. Die durch die Kombinationen *Streptomycin* + *INH* und *Streptomycin* + *PAS* herbeigeführten Unterschiede standen an der Grenze der Signifikanz während die Kombinationen *Thiomicid* + *PAS*, sowie *INH* + *PAS* keinen wesentlicheren Unterschied im Verhältnis zu dem einen, wirkungsvolleren Mittel ergaben.

Ähnlicherweise erwies sich keine der möglichen Dreierkombinationen wirksamer, als die aus ihren Elementen zu gewinnende beste Zweierkombination, wenn auch der zahlenmässige Wert der durchschnittlichen Lebensdauer weiter zunahm.

Bei gleichzeitiger Gabe aller vier Heilmittel war das Verenden der Mäuse äusserst gleichförmig, doch stieg die durchschnittliche Lebensdauer nicht mehr an. Es ist wahrscheinlich, dass bei gleichzeitiger Dosierung der vier Mittel auch mit der Summierung ihrer toxischen Eigenschaften gerechnet werden muss.

Das günstigste Resultat in unserem Experiment zeigte die Kombination der einzeln kaum wirkungsvollen Mittel *INH, Thiomicid und Streptomycin.* Eine ähnliche therapeutische Wirkung konnte erst mit fünfmal so viel Thiomicid, etwa der vierfachen Menge INH oder einer fast zehnfachen Quantität Streptomycin erzielt werden.

Fünf Mäuse verendeten in der ersten Woche des Experiments, ohne dass bei der Sektion an der Lunge charakteristische makroskopische Veränderungen zu erkennen gewesen wären, weshalb wir diese nicht ausgewertet haben.

Diskussion

In Tierexperimenten haben wir unsere früheren *in vitro* gemachten Beobachtungen bestätigt, welche auf die verschiedenen Wirkungsarten des INH des Streptomycins, der PAS und des Tb_1 hinwiesen.

Beim Vergleich der therapeutischen Wirkung der einzelnen Heilmittel kombinationen müssen wir in Betracht ziehen, dass die Alleinwirkung der einzelnen Mittel in unserem Experiment nicht gleichförmig war. Äusserst beachtenswert ist jedoch die Kombination *INH* + *Thiomicid.* Obwohl sich diese beiden Mittel einzeln als wirkungslos erwiesen, verlängerte kombiniert die gleiche Menge recht wesentlich die Lebensdauer der Mäusegruppen. In unserer vorangegangenen Mitteilungen wiesen wir *in vitro* nach und bestätigen dies in unserer gegenwärtigen Arbeit auch *in vivo*, dass INH und Thiomicid die Wirkung voneinander steigern. Da jedoch Thiomicid auf Mäuse weniger toxisch wirkt, als auf Menschen, ist die Umwertung unserer Ergebnisse auf humane Umstände erst nach gründlicher Überlegungen möglich.

Wenn wir Thiomicid und seine Kombinationen als ein in der Humantherapie nur beschränkt anwendbares Mittel ausser acht lassen, ist festzustellen, dass die beste therapeutische Wirkung von der gleichzeitigen Gabe von INH, PAS und Streptomycin zu erwarten ist, und zwar eine bessere, als von der Erhöhung der Dosis irgendeines der erwähnten Mittel.

Zusammenfassung

Wir untersuchten die therapeutische Wirkung der möglichen Kombinationen von INH, PAS, Tb_1 und Streptomycin in subtherapeutischen Mengen an mit dem *Ravenel*stamm *(M. tuberculosis typ. bovinus)* infizierten Mäusen. Die Heilmittelkombinationen besitzen gesteigerte Wirkung. Besonders führte die gemeinsame Anwendung von INH — Thiomicid zu beachtenswerten Ergebnissen.

LITERATUR

1. *Koczka, I.:* Acta Microbiologica, **1,** 23 (1954).
2. *Litchfield Jr., J. T.:* J. Pharm. Exp. Chemother. **97,** 399 (1949).
3. *Koczka, I.:* Im Druck. Kisérletes Orvostudomány. 1955.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПО СОВМЕСТНОМУ ПРИМЕНЕНИЮ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫХ ПРЕПАРАТОВ

И. Коцка

Резюме

Автор исследовал терапевтическое действие возможных сочетаний INH, PAS, Tb_1 и стрептомицина в субтерапевтических дозах, на мышах зараженных штаммом ***Ravenel*** **(M. tuberculosis typ. bovinus).** Сочетания препаратов обладают повышенной эффективностью. Заслуживающие внимания результаты были достигнуты в особенности комбинированным применением INH + Thiomicid.

EXPERIMENTAL PRODUCTION OF TETANUS ANTISERUM IN SHEEP

By

P. OLÁH

Phylaxia, State Institute for Vaccine Production, Budapest

(Received December 2, 1954)

It has been frequently requested that for subjects who were treated with horse serum and thus are liable to develop hypersensitivity, antisera produced in species other than the horse should be made available for the purposes of prevention or therapy.

Certain institutes in foreign countries have complied with this demand and supply antitoxic sera produced not only in the horse, but also in cattle and sheep. Earlier attempts at producing antitoxic sera in sheep have failed, partly because the sera were of low protective value [*Walbum*, 1], and partly because the yield of serum per bleeding was too little [*Marxer*, 2]. In lack of up-to-date data in the literature available to us, it was necessary to carry out the experiments described in the present paper. The work has resulted in producing in sheep antitoxic sera meeting practical requirements.

Materials and methods

Sheep of different breeds and ages were used in groups of 7 to 33 animals. The toxin or formol-toxoid used as antigen was prepared in Taylor broth. The formol-toxoid used in some cases was purified and concentrated according to *Boivin* [3]. The sera were assayed for antibody in mice by the method of *Ehrlich*, at least at four levels.

Experimental

Selection of animals for serum production

The selection of readily immunizable animals has been studied by numerous authors. The methods recommanded for this purpose, however, differ in practical value and have been devised for horses in the first place. As age and breed are usually substantial points in making the selection, sheep of different breeds and belonging to various age groups have been examined for antitoxin productivity.

Age. Kraus and *Sordelli* [4] have claimed that older animals yield more potent sera. I have found this valid for cattle in an earlier study [5].

The relationship between age and antitoxin yield was examined in a group of 10 sheep, of which five were older than five years and five were 1 year old or younger. The animals were immunised with equal volumes of the same antigen, inoculated at 3-day intervals. Antitoxin productivity was estimated partly on the basis of the highest antibody titre obtained on repeated sampling, partly from the average value of six successive samples. Each serum was tested for antibody titre at 4 levels differing by 50 I. U. around the anticipated level.

Although the relatively small number of animals tested does not permit any definite conclusions to be drawn, it was still striking that, contrary to what had been expected, old sheep did not produce more potent sera than young ones. The highest titre for 1-year old sheep was 346 I. U.; for animals older than 5 years, 314 I. U.; the average of six samplings was 220 I. U. for the 1-year old animals and 180 I. U. for those older than 5 years.

Breed. It is known from practice that certain breeds of horse or cattle produce antitoxic sera of above-average potency [*Becker*, 6].

In the light of this evidence, *Cigálya* and *Merino* sheep were examined for eventual differences in antitoxin production. A total of 15 animals, 8 *Merino* and 7 *Cigálya*, was examined in this series. Immunisation and titration of sera were performed by the methods described above. It has been found that the highest titres and the average antitoxin levels, as determined in 6 samples, were closely similar in both breeds, except for insignificant differences. (For *Merino* sheep, the maximum titre was 285 I. U., as compared with the 281 I. U. for *Cigálya* sheep, while the average titre of 6 samples was 184 I. U. for *Merino*, and 165 I. U. for *Cigálya.)*

Normal (natural) antitoxin level. Certain animals are known to have in their serum so-called normal antibody to bacterial toxins. *Sordelli* [7] and *Glenny* [8] consider such specimens more suitable for antitoxic serum production assuming that such animals would yield more potent sera.

Sera from 231 sheep of different ages, not immunised against tetanus, were tested for presence of normal antitoxin, but none was found to contain more than 1/200 I. U., which is the lowest value in the series. Therefore the attempt at elucidating the relationship between active antitoxin level and antitoxin productivity has failed.

Initial (basic) immunity

Since *Glenny*, *Hampton* and *Stevens* have published their report [9], basic immunity is usually induced with toxoid bound to $Al(OH)_3$ gel. It has been found namely that in the horse the protracted stimulation brought about

by percipitated anatoxin acts more thoroughly on the organism and hyperimmunisation with fluid antigen will more rapidly attain the desired titre. According to *Pfützner* [10], adsorbed antigen, particularly when injected repeatedly, induces such a high level of basic immunity as could be obtained with fluid antigen only after a long and cumbersome series of inoculations. On the basis of these observations, as well as of the experience obtained in this country in connection with active immunisation of sheep against tetanus (*Elek, Köves, Szélyes*, 11), the animals were inoculated subcutaneously with the same purified and concentrated anatoxin adsorbed onto $Al(OH)_3$ gel. The volume of the first inoculum was 5 ml, that of the second 10 ml. The sera were titrated for antibody 21 days following the first, and 14 days following the second, inoculation. Titration was performed at four levels, the steps being 0,5 I. U. after the first and 2 I. U. after the second inoculation. In Table I are shown the results of titrations after the first and the second inoculation, respectively, for a total of 33 sheep.

Table I

Serum titres after first and second inoculation

Titre of serum 21 days following first inoculation, I. U.

I. U.	<0,5	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5	> 20
Number of sheep	1	2	8	5	9	1	4	—	2	—	—	1

Titre of serum 14 days following second inoculation, I. U.

I. U.	5	6	8	10	12	15	18	25	35	40
Number of sheep	2	2	4	6	4	3	5	1	5	1

The data in Table I indicate that after both inoculations the serum antitoxin levels were highly variable. Most of the sera contained 1 to 2 I. U. after the first inoculation, while values lower or higher than these were rare. The second inoculation was followed by a considerable increase in antibody level and the values were several times higher than those obtained after the first inoculation. It must, however, be pointed out that in the same animal the titres brought about by the first and the second inoculation, respectively, developed independently of each other. In one animal, for instance, there were 0,5 I. U. in the serum after the first inoculation, while after the second the titre rose to 35 I. U. In other animals, on the other hand, the first inoculation

was followed by a conspicuous rise in antibody level (to values as high as 5 I. U.), while the second inoculation induced hardly any change in antibody titre.

Hyperimmunisation

The antibody level in the sera of animals with adequate basic immunity may be increased up to titres suitable for bleeding by means of serial inoculation of increasing doses. As data for sheep were not available, hyperimmunisation with fluid anatoxin and toxin was carried out with the following volumes and in the following order.

10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, ml of anatoxin	10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ml of toxin

The fluid anatoxin used was a purified preparation of 5 I. U. combining capacity. The toxin was freshly prepared before each inoculation ; its mouse MLD varied between 100 000 and 1 000 000. An interval of two weeks was observed between the two series of inoculation.

Role of the interval between inoculations

The effect of the length of time elapsed between immunising inoculations, on the increase in serum antibody level was examined. A group of 15 sheep was hyperimmunised as described above, with 3-day intervals between the single inoculations. Another group of 10 sheep was immunised in the same way, but in intervals of 7 days, instead of 3. Both groups were inoculated with the same purified and concentrated anatoxin (No. 205, 5 I. U.), and with toxins produced at different points of time, but nearly identical in potency (250 000 to 800 000 mouse MLD). Sampling for antibody estimation was made in 3-day intervals. It was found that in the case of 3-day intervals the antibody level began to rise only after the third anatoxin dose, and remained below 50 I. U. irrespective of the increase in the quantity of anatoxin. The first sharp rise in antibody titre occurred after the second inoculation with toxin and further inoculations were followed by a steady rise. In contrast with this, the antitoxin titre in animals inoculated in 7-day intervals increased above the 50 I. U. level already after the 2nd or 3rd anatoxin dose. The superiority of the longer interval is indicated also by the fact that 86 per cent of the 7-day interval animals have developed the 100 I. U. bleeding titre during serial inoculation period, while the 3-day interval animals have developed it only in 25 per cent, with 75 per cent of them

becoming suitable for bleeding considerably later, after the last inoculation with toxin.

Waiting time. In the series described above, the sheep were hyperimmunised 8 to 14 days after the development of basic immunity. According to *Ramon* [12] and *Glenny* [13], the duration of the period between induction of basic immunity and onset of hyperimmunising inoculations *(waiting time)* has a favourable influence on antibody production. The sera obtained by *Kemény* [14] from horses after a waiting time of six months were approximately twice as potent as those produced with a waiting time of only 2 weeks. The effect of waiting time was examined in a total of 27 sheep. Each animal was inoculated with 5 ml of precipitated concentrated anatoxin and was given another dose of 10 ml 3 weeks

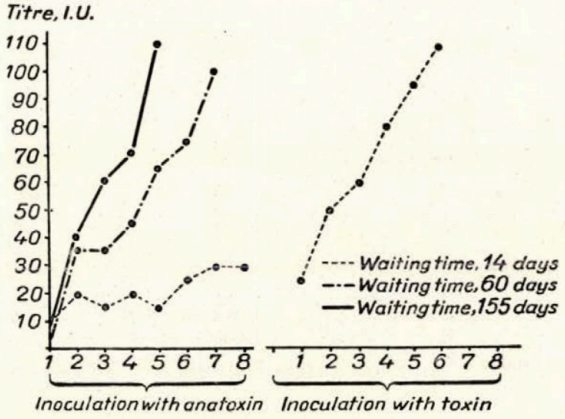


Fig. 1. Determination of the optimum time for bleeding

later. There were 3 groups. In group I, hyperimmunisation was begun 14 days, in group II 60, and in group III, 155 days after the second inoculation. The immunising inoculations were carried out in intervals of 3 days. The materials used were a fluid anatoxin of identical production, and toxins different in serial number but approximately equal in potency. The average titres immediately prior to the onset of hyperimmunisation were 11 I. U. for group I, 4,5 I. U. for group II, and 7 I. U. for group III. Unlike other species of animal, the different groups of sheep showed no difference in maximum antibody titre. On the other hand, there was a difference in the rate of antibody production, as shown in Fig. 1. The longer the waiting time, the more rapid was the antibody production. In the case of a waiting time of 14 days, the antibody titre of the serum rose only after the fifth inoculation, while in groups II and III the very first immunising inoculation already induced considerable antibody production. The bleeding titre (100 I. U.) was attained after the sixth inoculation in group I, while in groups II and III it was reached only after the 7th and 5th anatoxin inoculations, respectively.

Determination of the optimum time for bleeding

After bleeding there is a steep fall in antibody titre. By means of repeated inoculations, however, the antitoxin concentration can be re-adjusted to the adequate level. In horses, 3 increasing doses in a few days' intervals suffice to achieve this. [*Schneider*, 15, *Kemény* et al. 14]. This principle was followed in the sheep. In intervals of 3 days, 40, 50 and 60 ml of fluid toxin were inoculated. In order to determine the point of time most suitable for bleeding, the post-inoculation immune titre was repeatedly estimated. In this series 14 sheep were used ; from each of these animals a blood sample was taken every other day and

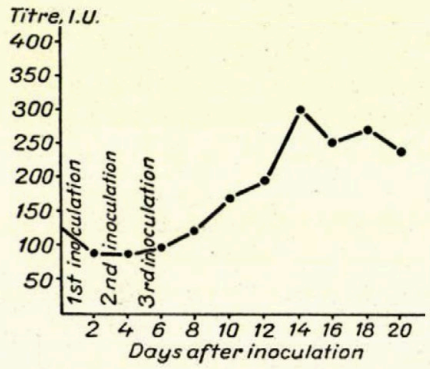


Fig. 2. Determination of the optimum waiting time

tested for antibody titre. The results are illustrated in Fig. 2. The values presented are the arithmetic means of the antibody values of sera from 14 sheep.

It may be seen that, apart from the fall after the first inoculation, there was a constant increase in serum antibody titre on successive inoculations, with the highest values falling on the 14th day following the first inoculation. This marks, in addition, the time most suitable for bleeding. Some individual titres, however deviated somewhat from the mean. Of the 14 sheep in 2 the antitoxin concentration was the highest on the 12th, day, in 3 on the 16th day, and in 9 on the 14th day.

Discussion

According to the literary data available, the most serious disadvantage of tetanus antiserum produced in sheep is the very low protective value. The work reported upon in the present paper was intended to find means of producing antisera of adequate potency for practical purposes.

One of the preconditions in the production of highly protective sera is the proper selection of readily immunisable animals. Unlike other animals, sheep show apparently no correlation between age or breed and antitoxin productivity.

Nevertheless, the tougher *Cigâlya* sheep are undoubtedly more resistant to toxins, as also proved by the relatively low incidence of premature death among them.

In spite of the large number of animals involved, the normal level of 1/200 I. U. of antitoxin could not be detected in the serum of any of the sheep examined. It therefore remains an open question whether the presence of a natural antibody level is a guarantee of increased antitoxin productivity. It has to be pointed out in this connection that our results are in disagreement with the data reported by *Valcarenghi* and *Richou* [16] who had claimed that sheep frequently possess normal antibody to tetanus.

Concentrated and purified precipitated anatoxin will induce, particularly on two inoculations, a high basic immunity. It appears that the antibody level induced by the second basic-immunity inoculation depends on the individual responsiveness of the animal and more susceptible animals respond to inoculation with a steeper rise in titre. In support of this view is the observation that animals developing high levels of antibody usually yield sera of higher value on bleeding.

The prolongation of the interval between the single hyperimmunising inoculations has an enhancing effect on antibody production. Only half as many inoculations in intervals of 7-days were required for attaining the bleeding titre than in 3-day intervals. The same was observed with respect to waiting time. The rate of antibody production increases in proportion to the length of waiting time. The practical importance of the investigations lies in the fact that, by prolonging both the interval between inoculations and the waiting time, the number of inoculations can be reduced, so that the danger of excessive stress represented by the inoculations is diminished.

The optimum time for bleeding changes from animal to animal, even within the same species. It may be stated, however, that in groups comprising a great numbers of animals, the highest serum antibody level may be expected on the 14th day following the first inoculation in the majority of the producers.

Summary

Attempts at using sheep for producing antisera of adequate protective value have brought the following results.

1. Old animals (above 5 years of age) did not produce more potent antisera than young ones.

2. There was no difference in antitoxin yield between sheep of breeds.

3. None of the sera from 231 sheep contained natural antitoxin in quantities of 1/200 I. U. or more.

4. Anatoxin purified and concentrated adsorbed onto $Al(OH)_3$ gel, when inoculated in doses of 5 ml and 10 ml in an interval of 3 weeks, induced a high basic immunity.

5. Sheep could be efficiently hyperimmunised by inoculating at 3-day intervals with purified and concentrated anatoxin and toxin. From both anatoxin and toxin a total of 8 inoculations each, increased in 10 ml steps, should be administered.

6. By prolonging the interval between immunizing inoculations from 3 days to 7 days, the number of immunising inoculations could be considerably reduced. The same was valid for the prolongation of waiting time.

7. The loss in antitoxin due to bleeding can be restored by administering 40, 50 and 60 ml toxin at 3-day intervals. The optimum time for bleeding was for most animals the 14th day following the first inoculation.

LITERATURE

1. *Kolle, W., Kraus, R., Uhlenhuth, P.:* Handbuch der Path. Mikroorg. 1928.
2. *Marxer, A.:* Technik der Impfstoffe und Heilsera. Braunschweig, 1915.
3. *Boivin, A., Izard, Y.:* C. R. Soc. Biol. **124,** 25 (1937).
4. *Kraus, R., Sordelli, A.:* Rev. del Inst. Bact. Buenos Aires **1,** 135 (1918).
5. *Oláh, P.:* Acta Microbiol. **2,** 91 (1954).
6. *Becker, M.:* Exp. Vet. Med. **5,** (1951).
7. *Sordelli, A.:* C. R. Soc. Biol. **85,** 314 (1921).
8. *Glenny, A. T.:* J. Path. Bact. **28,** 241 (1925).
9. *Glenny, A. T., Hampton, R., Stevens, A.:* Vet. J. **88,** 90 (1932).
10. *Pfützner:* Inaug. Diss. Berlin 1937.
11. *Élek, P., Köves, J., Szélyes, L.:* Acta Vet. Hung. **1,** 353 (1951).
12. *Ramon, G.:* Ann. Inst. Pasteur **47,** 339 (1931).
13. *Glenny, A. T.:* J. Hyg. **44,** 135 (1945).
14. *Kemény, L., Illés, E., Szotáczky, I.:* Acta Vet. Hung. **3,** 123 (1953).
15. *Schneider, L.:* Personal Communication.
16. *Valcarenghi, H., Richou, R.:* C. r. Soc. Biol. **114,** 597 (1933).

ОПЫТЫ ПО ПРОИЗВОДСТВУ ПРОТИВОСТОЛБНЯЧНЫХ СЫВОРОТОК ОВЕЦ

П. Олах

Резюме

Целью опытов являлось производство овечьих сывороток обладающих достаточной защитной способностью для применения в практике. В процессе исследований, проведенных в связи с подбором производящих сыворотку животных, авторы определили, что в отношении способности производства антитоксина не имеется разницы между овцами различного возраста и породы. Природные антитела против столбняка в количестве 1/200 И. Е. не удалось обнажужить ни у одного из 231 животных. В результате прививок 5—10 см³ очищенного, концентрированного анатоксина, адсорбированного к гелю $Al(OH)_3$, производимых последовательно с интервалами по 3 недели, развивается высокий базальный иммунитет. Гипериммунизация овец производилась в начале очищенным и концентрированным анатоксином в дозах 10—80 см³, а после двухнедельного перерыва — токсином в дозах 10—80 см³. Если продлим интервалы между отдельными иммунизирующими прививками, то для достижения подходящего для изъятия крови титра потребуется меньшее количество прививок. Путем продолжения интервала между моментом достижения базального иммунитета и началом гипериммунизации имеется возможность сокращения не только кратности иммунизирующих прививок, но и длительности гипериммунизации. Содержание антитоксина, снижающееся вследствие взятия крови, может быть снова повышено до необходимого для взятия крови титра путем введения токсина в дозах по 40, 50 и 60 см³ с 3 дневными интервалами. После окончания прививок наиболее высокое содержание антител в сыворотке наблюдается в различное время, но вообще оптимальным моментом взятие крови является 14 день после первой прививки. Средняя защитная ценность сывороток полученных от овец достигает ценность сывороток рогатого скота.

SEROLOGICAL AND BIOCHEMICAL TYPING OF E. COLI STRAINS OCCURRING IN VARIOUS WATERS

By

M. GREGÁCS

State Institute for Public Health, Budapest

(Received December 3, 1954)

The properties of *E. coli* strains occurring in faeces had been described by *Escherich* in 1885, and those of *Bacterium lactis aerogenes* to be found in milk and cheese, soon afterwards. Later investigators had described many similar strains, and comprised them under different names such as coli, coli group, aerogenes group, or simply the group of coliform microorganisms. Until quite recently, these bacteria were divided into three large groups, viz. the coli, aerogenes, and paracoli. Apart from morphological and cultural peculiarities of the strains, this division was principally based on biochemical methods. These methods did not, however, permit of any sharp demarcation between the individual groups, it being very difficult to classify even into these large groups some of the coliform strains produced from various materials. In consequence, many forms intermediate between the three main groups have been described, the paracoli group proving particularly heterogeneous. Yet, the necessity for exact identification from human and animal diseases and in connection with coli strains isolated in hygienic examinations, have never ceased to prevail.

For this reason, many attempts had been made at a serological classification of the coliform microorganisms until, after many failures, *Kauffmann* et al. [1, 2, 3] succeeded in putting it on a firm footing. Basing himself on these preliminary investigations, *Kauffmann* [4] ultimately classified the coli and aerogenes groups into the Escherichia and Klebsiella groups, while subdividing the paracoli group into several new groups.

It is owing to this theoretical research work that today we are able to determine exactly the coliform bacteria isolated in pathogenic processes and in connection with hygienic examinations, and to evaluate the significance of individual types. Within the field of hygienic examinations, particular interest is attaching to the serological determination of *E. coli* strains produced from samples of drinking-water. In a previous study [5] it was possible to isolate from 6265 water samples in 13 cases types O : 111, O : 55, or O : 26. In the Hungarian and foreign literature available, no details could be found regarding the serological distribution of other *E. coli* produced from water. This is what prompted the extension of the investigations to the serological determination

of *E. coli* strains to be found in water samples originating from different places.

Importance attaches to the serological determination of *E. coli* strains produced from water, because instead of unreliable fermentation tests it allows an exact serological procedure to decide the question as to whether or not *E. coli* strains from water samples indicate to a really large extent faecal contamination. It is with a view to deciding this very same question that the present study has been extended to the determination of the serological group of *E. coli* strains isolated from human faeces.

Methods

The serological studies involved the determination of the first 25 O groups most frequent according to *Kauffmann*. The 25 O-group sera required for agglutination were produced in the customary way in rabbits inoculated with the suspension of standard strains boiled for 2½ hours at 100° C. The average titre of the sera ranged from 1 : 1600 to 1 : 51,200. Cross-agglutination tests of immune sera were performed with the boiled suspensions of the 25 standard strains by means of tube agglutination beginning with the 1 : 100 dilution. Many strains yielded co-agglutination at a low titre, but this was invariably lower than the homologous titre of the sera. To be employed in the preliminary examinations, 8 polyvalent sera were prepared from the 25 O sera. The cross-agglutination tests showed each of these to consist of three monovalent sera, with the exception of one which consisted of four. The polyvalent sera were so selected as to be approximately of the same titre ; they were diluted beyond their cross-agglutination values, in order to suppress co-agglutination.

In O antigen determination the following procedure was adopted. From every water sample obtained, which revealed acid and gas formation when inoculated into lactose and phenol-red broth and yielded typical. *E. coli* colonies on Endo medium, slanting agar isolations were made. At the beginning, from each water sample 20 to 25 colonies were examined with a view to deciding whether morphological similarity concealed serological identity. The results showed that, for all practical purposes, the morphologically identical 25 colonies corresponded in each case to identical serological groups. Later on, therefore, only such colonies were determined as appeared to display morphological differences. The 24-hour slanting agar cultures were washed with physiological saline, and the suspensions were boiled for 2½ hours in a water bath at 100° C. First, each strain was preliminarily tested with the eight polyvalent sera. Following agglutination with a given polyvalent serum, tube agglutinations with its individual components were performed, beginning with the titre 1 : 100. Agglutination was read after 20 hours' incubation at 37° C. Each strain examined was taken to belong to that O group which in one of the sera agglutinated to the end titre of the strain, or one tube lower.

In carrying out the usual fermentation tests, the series recommended by *Kauffmann* [6] containing 13 carbohydrates and alcohols, respectively, was employed (adonitol, dulcitol, sorbitol, arabinose, xylose, rhamnose, maltose, salicin, inositol, lactose, mannitol, saccharose, and glucose). The observation period extended over 14 days at 37° C. The indol, methyl-red, and Voges-Proskauer reactions were made in cultures 3 to 5 days old. Growth on Simmons' sodium-citrate agar and urea decomposition on Christensen's nutrient medium were read after four days. The Eijkmann test was observed at 46° C for 48 hours, and gelatin liquefaction at 20° C for 30 days.

Results

A total of 1354 water samples had been examined. From these, 2000 *E. coli* strains were isolated and all of them subjected to serological identification. Of the 2000 strains, 700 were from 380 tap water samples, the other 1300

strains originating from 974 samples of well water, running water, or sewage. Of the 700 strains from tap water 101, or 14,4 per cent, and of the 1300 strains from well waters 197, or 15,1 per cent, could be classified in one or the other of the 25 O groups established by *Kauffmann*, *Knipschildt*, *Vahlne*. *E. coli* strains derived from other than drinking waters, e. g., running or refuse waters, yielded a higher proportion of classifiables, viz., 18,5 per cent. The fact merits attention that the same strains were dominant in the running and refuse waters, which were the most frequent in the drinking water samples. These were the O groups 8, 9, 16, and 17, making up more than half of all the classifiable strains. Their distribution as to percentage and grouping being almost identical, all the different waters have been combined in the first pair of columns in the annexed Table.

It will be seen from the Table, that groups 3, 14, and 24 of the first 25 O groups do not figure in it at all, and that the dominant types were 8, 19, 6, and 17, followed in respect of dominancy by 2, 20, 7, and 15. The number of strains that could be entered in the remaining groups was significantly less.

With a view to deciding whether the types of *E. coli* to be found in water may not be derived from possible faecal contamination, 500 coli strains isolated from the faeces of 300 healthy subjects, who had been presented to the Department as possible carriers of *S. typhi*, were subjected to serological group determination. Of the 500 *E. coli* strains from faeces 142, or 28,4 per cent, could be grouped within *Kauffmann*'s scheme. The second pair of columns in the Table shows the distribution over the O groups of the *E. coli* strains originating from faeces. It also reveals that again not all O groups were involved and that, once more, most of the classifiable strains belonged to groups 19, 8, 17, and 2.

On comparing the data concerning classifiable strains isolated from water and faeces, respectively, it will be seen that O groups 3, 14, and 24 do not figure among them at all, and that no strains from faeces were found to belong to groups 13, 16, and 18, these same three groups occurring but rarely among the strains from water, as well. Comparison of the two pairs of columns brings the interesting phenomenon to light that in the strains derived from both water and faeces the dominant O groups are 19 and 8, the two types between them giving 32,6 per cent of all classifiable strains isolated from water, and 30,3 per cent of those originating from faeces. If, in addition, we consider the more frequent types (17, 2, and 15), which total 23 per cent for the strains from water and 26 per cent for those from faeces, we find that 56,6 per cent of the strains from water and 55,7 per cent of those from faeces, i. e. more than half of all the strains classifiable according to type belong to the same five O groups.

Obviously, then, the group determinations performed support our previous assumption that *E. coli* strains occurring in drinking waters have their source in faeces, respectively in sewage and in surface waters contaminated by it.

Table

Distribution of E. coli strains according to O antigen

O group	Strains produced			
	from water		from faeces	
	number	percentage	number	percentage
1	4	1.4	11	2.8
2	20	6.7	13	9.2
3	—	—	—	—
4	7	2.3	8	5.6
5	6	2.0	4	2.8
6	32	10.7	7	4.9
7	17	5.7	6	4.3
8	49	16.5	19	13.4
9	6	2.0	1	0.7
10	2	0.7	5	3.5
11	3	1.0	8	5.6
12	3	1.0	9	6.3
13	2	0.7	—	—
14	—	—	—	—
15	17	5.7	9	6.3
16	2	0.7	—	—
17	32	10.7	15	10.6
18	2	0.7	—	—
19	48	16.1	24	16.9
20	18	6.0	—	—
21	12	4.0	3	2.1
22	8	2.7	—	—
23	2	0,7	—	—
24	—	—	—	—
25	6	2.0	—	—
Total number of classifiable strains	298	—	142	—
In per cent of all the strains examined	—	14.9	—	28.4

There are several data in the literature which stress the great variability of the biochemical properties alleged to be characteristic of the *E. coli* strains and differing hardly, or not at all, from the fermentation of the Klebsiella types. This fact has prompted us to study the fermentation properties of the *E. coli* strains isolated. It is not, however, proposed to go into all the details, it being considered sufficient to dwell here on those which the latest literature describes to be characteristic differences between the Escherichia and Klebsiella groups.

For all practical purposes, the typified strains isolated from faeces fermented like typical Escherichia. Of the 142 strains only 3 were indol negative, and another 3 Eijkman negative. The rest, 136 strains in all, showed typical behaviour both in the Imvic reactions and the carbohydrate series. Very interesting was, on the other hand, the variability in the biochemical properties of the *E. coli* strains isolated from water. From among 298 strains, 53, or 17,8 per cent, were indol negative ; 7, or 2,3 per cent, were methyl-red negative ; 12, or 4 per cent, gave a positive Voges—Proskauer reaction ; 34, or 11,4 per cent, were urea positive ; 61, or 20,4 per cent, were citrate positive ; while 191, or 64,1 per cent, were Eijkmann negative. Salicine positive were 194 strains, or 65,1 per cent, and adonitol positive 54, or 18,1 per cent. Not one of the strains fermented inositol.

The studies made show first the methyl-red, then the Voges-Proskauer reactions to be the most characteristic. It is noteworthy that the urea-decomposing strains were invariably found to be citrate-positive. The details concerning sugar decomposition give support to the empirical findings of *Kauffmann*, and *Edwards* and *Fife* [7], who regard inositol and adonitol negativity as the most characteristic features of the Escherichia group. A striking feature is the nearly 65 per cent negativity of the Eijkmann test in *E. coli* strains produced from water, although this is considered in some European states to be one of the most reliable tests in the identification of faecal *E. coli* strains.

If one compares the biochemical activity characteristic of *E. coli* types isolated from faeces with the fermentation of *E. coli* strains isolated from water, one is bound to assume that the differences between the two may be variation phenomena arising upon the effect of the new environment. In other words, it appears to be possible that while biochemically typical *E. coli* strains are encountered in waters freshly contaminated with faeces, the presence in them of a greater number of *E. coli* strains showing atypical fermention is indicative of older contamination.

Summary

1. Investigations have been carried out with a view to ascertaining whether it can be confirmed by serological tests that the presence of *E. coli* in water samples indicated faecal contamination.

2. From 1354 water samples 2000 coli strains have been isolated. Of the 2000 coli strains 700 originated from tap water samples, and 1300 from samples of well water, running water, sewage, etc.

3. Of the 700 strains from tap water, 101, or 14,4 per cent, and of the 1300 strains from well waters 197, or 15,1 per cent, could be classified into one or the other of the 25 O groups established by *Kauffmann*, *Knipschildt*, *Vahlne*.

4. Of the *E. coli* strains from running and refuse waters 18,5 per cent, i. e.,

more than of those from drinking waters, could be classed into one of the above-mentioned 25 O groups.

5. Out of 500 coli strains isolated from the faeces of 300 healthy subjects, presented to the Department as possible *S. typhi* carriers, 142, or 28,4 per cent, could be classified.

6. The same serologic groups were found to dominate among the strains isolated from drinking water as among those isolated from refuse waters and faeces, respectively. More than half, 56 per cent, of all classifiable strains were found to belong to the same five O groups. The fact that strains from waters and strains from faeces were found to be classifiable in equal proportions and into identical O groups, appears to confirm that the contamination of the waters is of faecal origin.

7. While the strains isolated from faeces fermented like typical *E. coli*, those derived from water showed a rather varied picture.

My thanks are due to Prof. K. Rauss, Director of the Institute of Microbiology, Pécs University, and to G. Ujvári, for their continued interest in the work and their valuable advice.

LITERATURE

1. *Kauffmann, F.:* Acta Path. Microbiol. Scand. **20** 21 (1943).
2. *Kauffmann, F.:* ibid. **21,** 20. (1944.
3. *Kauffmann, F.:* ibid. **21,** 46. (1944).
4. *Kauffmann, F.:* Enterobacteriaceae. Copenhague, 1951.
5. *Gregács, M.:* Hung. Sci. Acad., Enteral Section, 1953. (A lecture)
6. *Kauffmann, F.:* The Differentiation of Escherichia and Kelbsiella Types. Copenhague, 1952.
7. *Edwards, P. R., Fife, M. A.:* J. Infect. Dis. **19.** 92 (1952).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СЕРОЛОГИЧЕСКИХ И БИОХИМИЧЕСКИХ ТИПОВ ШТАММОВ E. COLI, ОБНАРУЖИВАЕМЫХ В РАЗЛИЧНЫХ ВОДАХ

М. Грегач

Р е з ю м е

Настоящими исследованиями автор — с одной стороны — желал выяснить индикаторную роль штаммов E. coli, выделенных из питьевой воды, а — с другой стороны — определить встречаемость, а также частость встречаемости установленных Кауфманом и его сотрудниками первых 25 групп «О».

В процессе исследовании автор из 1354 проб воды изолировал 2000 штаммов coli и произвел их классификацию по серологическим типам на основании «О» антигена. Из 2000 штаммов coli 700 штаммов происходили из будапештской воды, а 1300 штаммов — из проб провинциальной воды. Из 700 штаммов, изолированных из будапештской воды, 101 штамм (14,4%), а из 1300 штаммов, изолированных из провинциальной воды — 197 штаммов (15,1%) могли быть отнесены к какой-нибудь из первых 25 групп «О», установленных Кауфманом – Книпшильдом – Валне. Из нормальных испражнений 300 особ, присланных с целью выявления бациллоносителей тифа, автор изолировал 500 штаммов coli, из которых 142 (28,4%) могли быть внесены в схему Кауфмана. Из числа штаммов coli, изолированных не из питьевой воды, по типам могло быть распределено 18,5%, т. е. высший процент, чем из питьевой воды. В питьевой воде преобладали те же штаммы, как и в испражнениях и в сточных водах. Более чем половина (56%) типизированных штаммов входили в 5 тождественных групп «О» (8, 19, 17, 2, 15). Типизированные штаммы, выделенные из испражнений, практически ферментировали аналогично типичным штаммам E. coli в то время как изолированные из воды типы давали весьма разнообразную картину.

STUDIES ON COXSACKIE VIRUS INFECTION IN HUNGARY

II. STUDIES ON NEUTRALISING ANTIBODIES AGAINST FOURTEEN DIFFERENT TYPES OF COXSACKIE VIRUS IN INDIVIDUAL AND POOLED HUMAN SERA

By

V. BALÁZS and M. PINTÉR

Institute of Microbiology, University Medical School, Szeged

(Received December 8, 1954)

In Part I of this series it had been reported that the strains of Coxsackie virus isolated by us in Hungary could be identified as belonging to the types A_4, A_5 and A_6 [1]. It had, however, to be assumed that types other than these also occur in Hungary, in view of the fact that, according to data in the literature, there are at least 6 to 8 distinct types occurring throughout the world. For studying the relations of incidence, isolation of virus and typing of isolated strains are the common methods, but examination of sera from the healthy population for the presence of neutralising antibodies is also a suitable method, these remaining detectable for years after the actual infection. The method has been extensively used in studies on Coxsackie virus infection [2, 3]. In addition to individual sera, also pooled sera and preparations of gamma globulin have been examined by some authors for the presence of antibodies against the viruses of poliomyelitis and the Coxsackie viruses [4, 5]. The method, although not allowing a correct estimate of the frequency of infections, is suitable for determining the incidence of the different types of virus.

According to the results of typings, of the types occurring in Europe 6 belong to group A and 1 to group B. Types other than these have not been isolated. In the course of the investigations to be reported we have therefore attempted to obtain data on the incidence of the different types by means of neutralization tests against 14 types of Coxsackie virus.

Methods

Virus Strains. The standard strains, 10 group A and 4 group B strains, were made available by the State Institute of Public Health, Budapest. The institute had received the strains from *Dr. G. Dalldorf*, Albany, N. Y., U. S. A. For the neutralisation tests the viral material was prepared as follows. Mice, 1 to 2 days old, were inoculated subcutaneously with the strains of virus. At the onset of paralysis the animals were killed and after removal of the skin, head and viscera the torsos were homogenised in 4 volumes of physiological saline in a Waring blendor. The suspension so obtained was repeatedly frozen and thawed, then centrifuged and the supernatant stored in ampoules at $-20°$ C.

Prior to the neutralisation tests, the strains were titrated and the titres were calculated on the basis of the Reed-Muench formula. The titres for the strains of A_9, B_2, B_3 and B_4 type were below 10^{-6}, while those for the other strains were in the range from 10^{-6} to $10^{-8.5}$.

Sera. The individual sera were collected from children living in Szeged, who, at the time of blood withdrawal showed no sign of infectious disease. In addition to the individual sera, a pool of sera was also examined. This contained aliquot amounts of serum from a total of 2000 persons living in Szeged and belonging to different age groups.

Neutralisation test. Individual sera were tested for neutralisation in the following way. Sera diluted 1 : 5 were mixed with equal volumes of viral material containing 200 LD_{50}/0,03 ml. The mixture was left standing at room temperature for 1 hour and then a dose of 0,03 ml of the mixture was inoculated subcutaneously into 1 to 2-day old mice from the same litter. Each of the sera tested was either completely positive or completely negative, inasmuch as in the positive case all the inoculated animals survived, in the negative case all animals died, exhibiting typical symptoms. The method used for examining the pool of sera was similar to that described above. The final serum dilutions employed were 1 : 10, 1 : 50 and 1 : 250. In both cases 100 LD_{50} virus was used as control.

Results

In Table I are shown the results of neutralization tests yielded by the pooled sera. It is seen that the pool showed some degree of protective action against each of the 14 types of Coxsackie virus. Although this method of the neutralization test lends itself mainly for qualitative analysis, there were still some evident differences as to the single types. The strongest neutralising action was exerted by types A_1, A_2, A_4, A_5, A_{10} and B_4, inasmuch as partial protection against them was attained by a dilution of 1 : 250. In the other group of standard strains, types A_3, A_8, B_2 and B_3 were completely or partially neutralized by the 1 : 50 dilution. Only the 1 : 10 dilution was effective against three strains: in the case of type A_7 neutralisation was complete, while in the case of types A_9 and B_1 it was partial. Strains A_9 and B_1 were then tested on two more occasions and the results were similar. Positivity at a dilution of 1 : 2 cannot be considered specific because of the possibility of non-specific protection. Individual sera from ten children, 8 to 10 years old, were therefore examined against type B_1. Two of these sera proved to offer complete protection, so that the occurrence of antibody to type B_1 was confirmed and, accordingly, the partial protection afforded by the 1 : 10 dilution of the pooled sera may be considered specific.

Table I

Results of neutralisation tests with pooled human sera and different types of Coxsackie virus

Dilution	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	A_6	A_7	A_9	A_9	A_{10}	B_1	B_2	B_3	B_4
1 : 10	0/5	0/5	0/6	0/6	0/6	0/5	0/10	0/6	8/17	0/7	8/11	0/5	0/5	0/5
1 : 50	0/5	0/6	0/8	0/5	0/9	0/6	6/6	1/10	5/6	1/8	6/6	5/8	3/5	0/8
1 : 250	4/8	2/6	7/7	3/6	6/9	2/7	7/7	9/9	6/6	7/9	5/5	6/6	6/6	4/7
Control 100 LD_{50}	6/6	6/6	9/9	4/4	7/7	5/5	9/9	5/5	9/9	9/9	13/13	8/8	7/7	7/7

Numerator = number of mice succumbed.
Denominator = number of mice inoculated.

Next, it was endeavoured to elucidate the relationship between the high titres to certain strains shown by the pooled sera and the incidence of these particular strains. For this reason sera from 72 Szeged children were examined for the presence of neutralising antibodies to type A_4, a type shown by virus isolations to be frequent in that town.

Table II

Neutralising antibodies to type A_4 Coxsackie virus in sera from healthy children

Age group	Number of sera tested	Number of positive sera	Per cent positive
6—35 months	24	10	42
3—6 years	24	18	75
7—12 years	24	23	96

In Table II are presented the results of these neutralization tests. The percentage of positive sera was high in the first age group already, and beyond 7 years it was almost 100 per cent. This is in agreement with the neutralisation titre of the pooled sera, since the level of antibody to Coxsackie viruses is stabilised at around the titre of 1 : 100, which may be increased in consequence of the presence of high titre sera in the serum pool.

Discussion

In the past 6 years, a great number of Coxsackie virus strains have been isolated throughout the world. Typing, however, was carried out in a small part of the cases only, which explains the lack of detailed data as to the incidence of single types. The most meticulous elaboration of the isolated strains was carried out in the United States, where 16 different serological types were identified [6]. In other countries less strains have been typed, so that only certain types are known to occur there. According to the data in the literature available, the types identified in countries other than the United States are the following.

France, A_1, A_2, [6]
Germany, A_2 [7]
The Netherlands, A_1, A_2, A_3, B_1 [8, 9]
Hungary, A_4, A_5, A_6 [1]
Egypt, A_1, A_2, A_3, A_4, A_6, A_7, A_{10}, B_3 [6]
Israel, A_1, A_2, A_3, A_4, A_6, A_8 [6]
Australia, A_4, A_5, B_2, B_3, B_4 [5]

South Africa, B_4 [10]
Alaska, A_{10} [11].

These data give an only incomplete picture of the actual spread of different types and many more strains should be isolated and typed in order to obtain more detailed information.

There have been attempts at estimating the incidence of different types on the basis of the specific antibodies detectable. In gamma globulin prepared in Denmark, *Melnick* demonstrated antibodies to the types A_1, A_4, B_1 and B_2 [2], while *Banker* and *Melnick* demonstrated antibody to type A_{10} [11]. In British gamma globulin Stanley detected A_5 and B_2-type antibodies [5]. It was also Stanley, who from human serum pools demonstrated the occurrence in Australia of types B_2, B_3 and B_4. These types of Coxsackie virus were also isolated [5]. *Banker* showed the presence of neutralising antibody to types A_1, A_4, B_1 and B_3 in sera from residents of Bombay [12]. In Germany, *Klöne* studied type A_2 and found that specific antibodies were present in a high percentage of the healthy population [13].

The results of neutralisation tests with pooled sera indicate that in Hungary, too, those strains predominate which have been most frequently encountered in Europe. In sevaral countries of Europe were the first 6 members of Group A isolated and this fact, supported by the results of neutralisation tests, suggests that these types are wide-spread in Europe. The almost 100 per cent incidence of antibody to type A_4 in the sera from Szeged children is just another confirmatory evidence. A similarly high incidence of A_4-type antibody has been reported by other authors, too. In a district in the U. S. A., *Melnick* has found that 60 normal sera all contained antibody to type A_4 [2]. A 100 per cent incidence was found in Bombay by *Banker* [12], while *Banker* and *Melnick* recorded an almost 100 per cent incidence in sera from Alaskan Eskimos [11]. All these data, and also our own observations, indicate that type A_4 is rather frequent in most areas of the globe.

The pool of sera examined in the present study gave only slight protection against types A_7 and A_9. These types are apparently less wide-spread than the others. The neutralisation titre against type 8 was also low, although this type is frequently encountered in America and presumably is not infrequent in Western and Northern Europe either.

The results obtained indicate that in Hungary at least 14 types can be expected to occur, some of them frequently, while others sporadically or at intervals only. From the data the conclusion is drawn that in other countries of Europe, too, more types occur than those so far isolated.

Note. The Dalldorf nomenclature has been used throughout this study even if in some papers cited the types are termed differently. The various designations were adapted on the basis of the paper by J. L. Melnick (The Coxsackie Group of Viruses. Annal. N. Y. Acad. Sci. 56, 587 (1953)).

Summary

1. Neutralising antibodies to 14 different types of Coxsackie virus strains have been examined. The pooled sera from 2000 inhabitants of Szeged showed neutralisation against all 14 types. The effective dilutions were, 1 : 10 for types A_7, A_9 and B_1 ; 1 : 50 and 1 : 250 for the other types.

2. Sera from 72 children belonging to various age groups and living in Szeged were examined for the presence of antibody to type A_4. The incidence of antibody neutralising this type increases with age and in the age group of 7 to 12 years it was almost 100 per cent.

LITERATURE

1. *Pintér, M., Balázs, V.:* Acta Microbiol. Hung. **2,** 161 (1954.)
2. *Melnick, J. L., Ledinko, N.:* J. Exp. Med. **92,** 463 (1950).
3. *Beeman, E. A., Cole, R. M., Huebner, R. J.:* Am. J. Hyg. **56,** 215 (1952).
4. *Bodian, D.:* Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. **72,** 259 (1949).
5. *Stanley, N. F., Dorman, D. C., Ponsford, J.:* J. Immunol. **71,** 402 (1953).
6. *Contreras, G., Barnett, V. H., Melnick, J. L.:* J. Immunol. **69,** 395 (1952).
7. *Vivell, O., Schairer, J.:* Arch. Virusforsch. **5,** 84 (1953).
8. *Verlinde, J. D., Tongeren, A. E.,* v.: Antonie v. Leeuwenhoek **18,** 239 (1952).
9. *Schaeffer, L. F.:* Needld. Tdschr. Geneesk. **95,** 2938 (1951).
10. *Patz, J. M.:* South-Afr. Med. J. **27,** 397 (1953) (ref.: Ztrbl. f. Bakt. Ref. **153,** 356 (1954).
11. *Banker, D. D.: Melnick, J. L.,* Am. J. Hyg. **54,** 383 (1951).
12. *Banker, D. D.:* Indian J. Med. Sci. **6,** 733 (1952).
13. *Klöne, W.:* Dtsch. Med. Wschr. 181 (1952).

ИЗУЧЕНИЕ ЗАРАЖЕНИЙ ВИРУСОМ COXSACKIE В ВЕНГРИИ II.

Изучение нейтрализующих антител к 14 различным типам вируса Coxsackie в индивидуальных и смешанных человеческих сыворотках

В. Балаж и *М. Пинтер*

Резюме

1. Авторы ставили опыты нейтрализации против 14 различных штаммов вируса Coxsackie. Исследовали нейтрализующее действие смеси изготовленной из сывороток 2000 жителей г. Сегед и установили, что смесь эта содержит антитела против всех 14 типов. Смесь полностью или частично нейтрализовала типы A_7, A_9 и B_1 в разведении 1 : 10, а остальные типы в разведениях 1 : 50 и 1 : 250.

2. Авторы исследовали нейтрализующее действие сывороток сегедских детей различного возраста против штамма типа A_4. Определили, что встречаемость антител повышается вместе с возрастом и в возрастной группе от 7 – 12 лет достигает около 100%.

TYPENBESTIMMUNG, VIRULENZ UND FERMENTAKTIVITÄT DER SCHARLACH-STREPTOKOKKENSTÄMME IN UNGARN

Von

I. FÜRÉSZ, I. MIHÁLYFI, B. LÁNYI und K. GÁL

Staatliches Institut für Volksgesundheitswesen, Budapest

(Eingegangen am 9. Dezember 1954)

Die Gruppen- und Typenbestimmung der hämolytischen Streptokokken ist unerlässlich bei jeder diesbezüglichen Forschung. Die in Ungarn im Jahre 1948 begonnene und ausserordentlichen Umfang erreichende Scharlach-Epidemie stellte uns die Frage, ob diese mit den Epidemien in den Nachbarländern in Zusammenhang sei. Die Frage konnte nur durch Typenbestimmung der hämolytischen Streptokokken beantwortet werden.

Die Streptokokken wurden in den Jahren 1949—51 und 1953 aus dem Rachen von ins Krankenhaus soeben aufgenommenen Kranken gezüchtet, d. h. vor der Penicillinbehandlung und bevor noch eine eventuelle Kreuz- oder Mischinfektion mit anderen Streptokokkentypen stattfinden hätte können.

Ausser der Gruppen- und Typenbestimmung wurden zwei Fermentaktivitäten, — die Streptokinase- und Hyaluronidaseaktivität — untersucht.

Methoden

Die Gruppenbestimmung wurde mit Präzipitation der Substanz «C», nach *Fullers* [1] Methode, die Typenbestimmung mit Hilfe des *Griffith*schen [2] «slide agglutination» (Substanz «T») durchgeführt. Zur Bestimmung der Streptokinaseaktivität benützten wir Humanplasma, das mit *pH* 7,6 Boratpufferlösung 1 : 3 verdünnt wurde, ferner die überstehende Flüssigkeit eines 24stündigen, 0,4% Dextrose enthaltenden Todd-Hewitt Bouillonkultur des Stammes und eine reine (Hoffman-La Roche) Thrombinlösung. Die Reaktion wurde bei 37° C im Wasserbad durchgeführt und wenn positiv mit 1, 2, 3 Kreuzen bezeichnet demgemäss ob die Auflösung des Fibrinknötchens mit 0,1 ml der unverdünnten, der 1 : 10 oder 1: 20 verdünnten überstehenden Flüssigkeit der Bouillonkultur stattfand.

Die Hyaluronidaseaktivität wurde mit der von *McClean* [3] ausgearbeiteten und nach unser Verfahren modifizierten sogenannten M. C. P. Probe (Mucin clot prevention test) ausgeführt. Die Hyaluronsäure, respektiv das Natriumhyaluronat wurde ebenfalls mit Hilfe der modifizierten McClean-Methode aus Nabelschnuren hergestellt. Zur Reaktion benützten wir eine 4%ige Natriumhyaluronatlösung, dazu wurde die überstehende Flüssigkeit einer 24stündigen Pope-Bouillonkultur des Streptokokkus-Stammes hinzugefügt. Die Reagenzröhrchen wurden 30 Minuten im Wasserbad bei 37° C gehalten, dann fügten wir das MCP-Reagens, also Essigsäure dazu. Die Stärke der Reaktion wurde ebenfalls mit 1, 2, 3 Kreuz positiv bezeichnet, demgemäss ob 0,2 ml der unverdünnten, der 1 : 100 oder der 1 : 1000 verdünnten überstehenden Flüssigkeit der Bouillonkultur die Knötchenbildung hemmte.

Resultate

Insgesamt wurden 672 Stämme typisiert. 522 wurden während der Jahren 1949—51 gezüchtet. Von diesen gehörten 513 zur Gruppe «A» und 9 zur Gruppe

«C». Im Jahre 1953 typisierten wir 150 Stämme, von diesen gehörten 146 zur Gruppe «A», 3 zur Gruppe «C» und wir fanden einen Stamm, der zur Gruppe «G» gehörte.

Die verschiedenen Typen der Gruppe «A» stellt Tabelle I dar.

Tabelle I

Typen der Gruppe «A»

Typ	1949—51		1953	
	Zahl	%	Zahl	%
4	232	45	45	31
1	161	31	40	27
6	14	3	24	16
3	8	2	—	—
13	7	2	—	—
2	6	1	—	—
12	—	—	3	2
25	1	0	1	1
8	1	0	—	—
23	1	0	—	—
*n. t.	82	16	33	23
Insgesamt:	513	100	146	100

* Nicht typisierbar.

Während der Jahren 1949—51 gehörte der grösste Teil der Stämme zu den Typen 4 (4/24/29) und 1, den Typ 6 fanden wir nur in 3%. Auch im Jahre 1953 fanden wir am häufigsten die Stämme der Typen 4 (31%) und 1 (27%). Bemerkenswert ist, dass Typ 6, der in den vorigen Jahren kaum zu finden war, (3%), im Jahre 1953 16% der Stämme repräsentierte.

In unseren weiteren Untersuchungen wollten wir die Fermentaktivität der erwähnten 150 hämolytischen Streptokokkenstämme prüfen und suchten einen eventuellen Zusammenhang zwischen Virulenz und Fermentaktivität.

Die sogenannten «Agressivitätsfaktoren» sind bei der Streptokokken-Gruppe als erythrogenes Toxin, Hämolysin oder Streptolysin O und S, Leukocidin, Fibrinolysin oder Streptokinase und Hyaluronidase bekannt. Es muss aber schon jetzt betont werden, dass die Virulenz der Stämme hauptsächlich mit den verschiedenen Teilen der Bakterienzelle, d. h. mit den verschiedenen Antigenkomponenten in engem Zusammenhang steht.

Zwei der erwähnten Faktoren, die Streptokinase- und die Hyaluronidaseaktivität der Stämme wurden geprüft, da eben der Zusammenhang zwischen Virulenz und Aktivität dieser zwei Enzyme in der Weltliteratur als am meisten problematisch betrachtet wird.

Das Resultat der Streptokinase- und Hyaluronidasebestimmung zeigen die folgenden Tabellen.

Tabelle II zeigt den Vergleich der Häufigkeit der Fermentaktivitäten.

Tabelle II

Häufigkeit der Fermentaktivitäten

Hyaluronidase	Streptokinase	Zahl	%
neg.	neg.	12	8
pos.	neg.	5	3
neg.	pos.	81	54
pos.	pos.	52	35
	Insgesamt: ...	150	100
Hievon:	übereinstimmend	64	43
	verschieden	86	57

Es ist klar, dass es keine Übereinstimmung zwischen Streptokinase- und Hyaluronidasebildung der Stämme gibt. Nur bei 64 (43%) Stämmen waren die beiden Fermentaktivitäten übereinstimmend, bei 86 (57%) dagegen verschieden. In grösster Zahl gab es diejenigen Stämme, die keine Hyaluronidase bildeten, doch Streptokinaseaktivität zeigten. (81). Dann folgten die Stämme, und zwar 52, bei deren wir beide Fermentaktivitäten, nachweisen konnten und am seltensten kamen jene Stämme vor — bloss 5 — welche Hyaluronidase bildeten, doch keine Streptokinaseaktivität aufwiesen.

Tabelle III

Hyaluronidase- und Streptokinase-Aktivität der 150 geprüften Streptococcus haemolyticus Stämme

Hyaluronidase	Streptokinase					Hyaluronidase insgesamt	
	neg.	+ 1:1	++ 1:10	+++ 1:20	pos. zusammen	Zahl	%
Neg.	12	48	20	13	81	93	62
+ 1:1	1	—	—	1	1	2	1
++ 1:100	4	28	14	6	48	52	35
+++ 1:1000	—	1	1	1	3	3	2
Pos. zusammen	5	29	15	8	52	57	38
Streptokinase insgesamt. Zahl	17	77	35	21	133	150	100
%	11	52	23	14	89	100	—

Noch deutlicher erscheint der Unterschied, wenn wir auch den Grad der Fermentaktivität in Betracht nehmen. Dies zeigt Tabelle III, in welcher wir die Fermentaktivitäten mit +, ++, +++ bezeichneten, je nach der Verdünnung der Bouillonkultur, die noch eine positive Reaktion gab.
(Auch Tabelle III zeigt es klar, dass wir 81 Stämme fanden, die Streptokinase bildeten, aber keine Hyaluronidaseaktivität aufwiesen, und nur 5 Stämme, bei denen die Lage umgekehrt war.) Unter den 150 Stämmen waren nur 57 (38%) Hyaluronidase positiv, 133, (89%), dagegen zeigten Streptokinaseaktivität. Es ist interessant, dass die Hyaluronidasebildung am häufigsten, bei 52 Stämmen mittelmässig war, stark oder schwach positive Stämme gab es nur 3 bzw. 2, unter den 133 streptokinasebildenden Stämmen dagegen waren die meisten, 77 schwach positiv. Die Verschiedenheit des Grades der Reaktion zeigen die im Diagonale liegenden Daten : die mit je + bezeichnete war bei keinem, die mit ++ bereichnete bei 14, und die mit +++ bezeichnete Reaktion nur bei einem einzigen Stamm übereinstimmend.

Zusammenfassend zeigen die Tabellen, dass die Hyaluronidasebildung eine minder beständige Eigenschaft der Stämme darstellt, als die Streptokinasebildung, wenn aber ein Stamm Hyaluronidase bildet, so ist diese Fähigkeit ausdrücklicher, als die Streptokinaseaktivität. Die Streptokinaseaktivität geht mit der Hyaluronidasebildung nicht parallel.

Es ergeben sich bemerkenswerte Feststellungen, wenn die Hyaluronidase- und Streptokinaseaktivität nach Typen untersucht wird. Unsere diesbezüglichen Angaben stellt Tabelle IV. dar.

Tabelle IV

Fermentaktivität nach Typen

Hyaluronidase	Streptokinase	Typen			
		1	4	6	?
neg.	neg.	7	2	3	—
pos.	neg.	—	1	1	3
neg.	pos.	33	7	18	17
pos.	pos.	—	35	2	13
	Insgesamt :	40	45	24	33
	Hievon :				
pos. zusammen		—	36	3	16
	pos. zusammen	33	42	20	30

Von den 40 Stämmen des Typs 1 besass kein einziger Hyaluronidaseaktivität, 33 Stämme hingegen erwiesen sich als streptokinasepositiv. Von den am häufigsten gefundenen 45 Stämmen des Typs 4 bildeten Hyaluronidase 36, und etwas mehr, 42, Streptokinase. Die Stämme des Typs 6 besassen, obzwar in geringerer Zahl, eine gewisse Hyaluronidaseaktivität. Von den 33 nicht typisierbaren

Stämmen konnte Hyaluronidaseaktivität bei 16 nachgewiesen werden. In Tabelle IV wurde es nicht angezeichnet, dass der einzige Stamm der Gruppe «G» hyaluronidase- und streptokinasepositiv war, von den 3 Stämmen der Gruppe «C» waren alle hyaluronidase- und 2 auch streptokinasepozitiv. Nach den Angaben unserer Tabellen können wir feststellen, dass die Streptokinaseaktivität der in Ungarn und in den Nachbarländern am häufigsten vorkommenden Typen eine sozusagen beständige Eigenschaft ist, Hyaluronidaseaktivität dagegen besitzen nicht alle Typen und die Hyaluronidaseaktivität fehlt vollständig bei den Stämmen des Typs 1. Hieraus folgt, dass die Verschiedenheit der Typen sich nicht nur in der Antigenstruktur, bzw. in der Verschiedenheit der Substanz T zeigt, sondern auch in den biologischen Eigenschaften der Stämme. Eben deshalb wollten wir weiterhin klären, ob es in der Virulenz der den verschiedenen Typen angehörenden und verschiedene Fermentaktivität zeigenden Stämme einen Unterschied gebe.

Zur Virulenzprüfung wählten wir also die in der Tabelle V dargestellten 9 Stämme.

Tabelle V.

Die zur Virulenzprüfung ausgewählten Stämme

Bezeichnung der Stämme	Hyaluronidase	Streptokinase	Typ
46	+++	+++	6
16	+++	++	4
29	+++	+	6
130	++	+++	*
131	++	+++	4
11	++	++	1
77	–	+++	25
10	–	–	1
76	–	–	4

* (Gruppe «C»)

Unter diesen befinden sich Stämme von verschiedenen Typen und Fermentaktivitäten, solche also, bei denen beide oder eine der Fermentaktivitäten stark, schwach positiv, eine oder beide negativ waren.

Wir hatten die Absicht den LD_{50}-Wert der Stämme zu bestimmen. Als erste Orientierungsproben wurden 3—3 Mäuse mit 0,5 ml der 24stündigen Bouillonkultur intraperitoneal geimpft. Nach 24 Stunden blieben fast sämtliche Versuchstiere am Leben und nur am zweiten bzw. dritten Tag waren mehrere Todesfälle zu verzeichnen, es konnte aber an deren Zahl keine Regelsmässigkeit festgestellt werden. Selbst die doppelte Dosis konnte die Versuchstiere

in 24 Stunden nicht vernichten, nach 48 Stunden dagegen sind sämtliche Mäuse umgekommen. Bei derart grosser Bakterienzahl kann man sich aber über der Virulenz kein Bild schaffen, da in solcher Menge selbst apathogene Bakterien die Versuchstiere vernichten können.

Hieraus folgt, dass unsere sämtlichen geprüften Stämme, immerhin zur Zeit der Prüfung, avirulent, besser gesagt für Mäuse apathogen waren, ungeachtet der Typenzugehörigkeit und ihrer Hyaluronidase- bzw. Streptokinaseaktivität. Es konnte zwischen Fermentaktivität und Virulenz also kein Zusammenhang festgestellt werden.

Ferner wurden die Stämme Nr. 10 und 76, die laut Tabelle V. hyaluronidase- und streptokinasenegativ waren, in weissen Mäusen weiter geimpft und zwar in der Weise, dass 0,5 ml der 24stündigen Bouillonkultur intraperitoneal eingeführt wurde. Am nächsten Tage wurden die Mäuse getötet und die Keime vom Herzblut gezüchtet. Diese Kultur wurde wiederum weitergeimpft. In solcher Weise führten wir 32 Passagen durch. Nach der letzten Passage prüften wir die Virulenz dieser Stämme und zum Vergleich auch die der ursprünglichen Stämme. Die Ergebnisse stellt Tabelle VI dar.

Tabelle VI

Resultate der Virulenzprüfung

Bezeichnung der Stämme	Impfdosen, ml		
	0,2	0,3	0,5
St_{10}	1/4	1/4	2/4
Stp_{10}	3/4	4/4	4/4
St_{76}	0/4	1/4	2/4
Stp_{76}	4/4	4/4	4/4

Zähler: umgekommene Tiere.
Nenner: geimpfte Tiere.

Hier wurden die ursprünglichen Stämme mit St, die weitergeimpften mit Stp bezeichnet. Der ursprüngliche Stamm Nr. 10 vernichtete von 12 Mäusen bloss 4, der weitergeimpfte dagegen 11. Noch auffälliger ist der Unterschied bei Stamm Nr. 76, deren ursprüngliche Kultur bloss 3, die weitergeimpfte sämtliche Mäuse tötete.

Die Virulenz hat sich also während der Passagen, wie das zu erwarten war, gesteigert, d. h. die avirulenten Stämme wurden virulent. Die Hyaluronidase- und Streptokinaseaktivität dieser virulent gewordenen Stämme wurde wiederum geprüft und es konnte festgestellt werden, dass diese virulenten Stämme ebenfalls hyaluronidase- und streptokinasenegativ blieben, wie die avirulenten, ursprünglichen Stämme. Es besteht also zwischen Virulenz, d. h. zwischen Mäusepathogenität und Fermentaktivität kein Zusammenhang.

Es muss bemerkt werden, dass die Kolonieform sämtlicher Stämme auf Blut-Agarplatte die sogenannte «*glossy*» Form war. Während der Passagen hat sich die Form geändert und schon nach einigen Überimpfungen zeigten die Stämme die sogenannte «*matt*» Form. Die Entwicklung der Mäusepathogenität steht also, wie bekannt, in engem Zusammenhang mit der morphologischen Änderung der Kolonien.

Diskussion

Typenbestimmung. Wenn wir unsere Ergebnisse mit denen der Nachbarländern vergleichen, können wir folgendes feststellen :

In den Jahren 1937—46 waren in der Sowjetunion nach *Joffe's* [4] Angaben Typen 1 und 10 in Übergewicht. In 1947 erschien Typ 4 und während der grossen Winterepidemie 1947—48 dominierten Typen 1 und 4, dagegen kam Typ 10 nur in 8—10% vor. In Rumänien, nach *Ciuca* [5] und *Baldovin.* [6], war in den Jahren 1930 bis 1940 Typ 10 von grösster Bedeutung, Typ 4 kam in dieser Zeit überhaupt nicht vor, er tritt aber in erster Linie während der interepidemischen Periode zwischen 1945 und 1948 auf. Zwischen 1948 und 1950 dominierte Typ 1, dem folgte Typ 4 und dann Typ 6. Nach den Angaben von *Strauss* [7] und *Raska* [8] sind in der Tschechoslowakei ebenfalls Typen 1 und 4 am häufigsten. (In den letzten Jahren gab es aber in der Tschechoslowakei keinen sogenannten «epidemischen Typ», dagegen kamen die verschiedensten Typen vor). In der Sowjetunion und in Polen sind ebenfalls Typen 1 und 4 die häufigsten. (*Wigodtschikow* [9], *Pakula* [10]). Typ 6, der jetzt in Ungarn in grösserer Zahl vorkommt, erschien in Rumänien schon in den vorigen Jahren häufiger.

Diese Angaben weisen darauf hin, dass die in den erwähnten Ländern herrschenden Epidemien von einander nicht isoliert sind. Dies wird ausserdem auch durch die überall milde Form der Erkrankungen unterstützt. Im milden Ablauf spielt allerdings auch die Penicillinbehandlung eine wichtige Rolle, und da die Penicillintherapie der Scharlachkranken vor Jahren eingeführt worden ist, schien es uns wichtig die Penicillinempfindlichkeit der im Jahre 1953 gezüchteten 150 Streptokokkenstämme zu bestimmen. Diese Untersuchung war auch deswegen interessant, weil die Anzahl der penicillinresistenten Keimen auch in Ungarn stets zunimmt. Dies ist gültig erstens auf die Staphylokokken und zwischen denen hauptsächlich auf die aus dem Rachen gezüchteten Stämme. Wir prüften also die 150 hämolytischen Streptokokkenstämme im Röhrchentest und parallel mittels unseren Plattentestes. Es konnte festgestellt werden, dass es keinen einzigen penicillinresistenten Streptokokkusstamm gab. Wir fanden nur 6 Stämme deren Wachstum 0·5 Einheiten pro ml Penicillin nicht hemmten und einen, dessen Empfindlichkeit zwischen 3—5 Einheiten war, zweidrittel der Stämme erwiesen sich gegen 0,1 Einheiten, viele Stämme sogar gegen 0,05 Einheiten empfindlich. Dieses Resultat unterstüzt die Richtigkeit des Verfahrens,

dass sie am selben Tag im selben Krankenzimmer aufgenommen Scharlachkranken nach einer 6tätigen Penicillinbehandlung entlassen werden können. Es weist auch darauf hin, dass das Penicillin sich noch immer als unser bestes Mittel gegen den Erreger des Scharlachs bewährt.

Fermentaktivität. Von einer eingehenden Besprechung der betreffenden Literatur soll abgesehen werden. Dennoch wollen wir erwähnen, dass laut Ansicht mehrerer Forscher zwischen Virulenz und Fermentaktivität der hämolytischen Streptokokken kein Zusammenhang besteht. (*Swift* und *Mitarbeiter* [11], *Sherwood* und *Russel* [12], *Boas* [13], *Humphrey* [14].) Mehrere andere sind aber der gegengesetzten Meinung. (*Hadfield*, *Magee* und *Perry* [15], *Kass* und *Seastone* [16], *Hirst* [17], *Rothbard* und *Todd* [18].) Hauptsächlich wird die Rolle der Hyaluronidasebildung bestritten. Es wird allgemein angenommen, dass jene Streptokokken virulent sind, die eine Hyaluronsäure enthaltende Kapselsubstanz besitzen. In der Virulenz spielt also nicht die Hyaluronidase, viel mehr die Hyaluronsäure eine Rolle; da aber eben die kapselbildenden Stämme auch Hyaluronidase bilden, ist unserer Meinung nach Hyaluronidase nicht als Faktor, sondern viel mehr als Indikator der Virulenz zu betrachten. Nach Angaben der neuesten Literatur spielt die Substanz M eine entscheidende Rolle in der Virulenz der hämolytischen Streptokokkenstämme. Die Substanz M ist nur in den «*matt*» Kolonien zu finden. Die glatten, «*glossy*» Kolonien enthalten keine M Substanz und sind auch avirulent. Es soll erwähnt werden, dass *Elliott* im Jahre 1945 nachgewiesen hat, dass Streptokokken verschiedenen Typs eine Proteinase bilden, welche fähig ist Substanz M abzubauen. Die Analogie zwischen M-Substanz und Proteinase einerseits, und zwischen Hyaluronsäure und Hyaluronidase anderseits scheint unserer Meinung nach klar zu sein.

Da sämtliche von uns geprüften Stämme aus Scharlachkranken gezüchtet worden sind, also zweifellos pathogen waren, deuten die Ergebnisse unserer Untersuchungen dahin, dass weder die Fermentaktivität, die Typen- oder Gruppenzugehörigkeit, noch die Tierimpfung dazu geeignet sind die Humanpathogenität der Streptokokkenstämme bestätigen zu können.

Zusammenfassung

Es wurden 672 hämolytische Streptokokkenstämme typisiert, die in den Jahren 1949—51 und 1953 aus dem Rachen von ins Krankenhaus soeben aufgenommenen Kranken gezüchtet worden sind.

Zur Gruppe «A» gehörten 659, zur Gruppe «C» 12 Stämme und wir fanden einen Stamm, der zur Gruppe «G» gehörte. Innerhalb der Gruppe «A» kamen die folgenden Typen am häufigstem vor : Typ 4, Typ 1, Typ 6.

Die Penicillinempfindlichkeit der 150, im Jahre 1953 gezüchteten Stämme wurde bestimmt : es waren keine resistenten Stämme zu finden.

Weiterhin wurde die Hyaluronidase- und Streptokinaseaktivität der 150 Stämme geprüft. 89% der Stämme bildete Streptokinase und 38% Hyaluronidase. Die Stämme des Typs 1 zeigten keine Hyaluronidaseaktivität.

Mit 10 Stämmen wurde die Virulenzprobe durchgeführt. Sämtliche Stämme erwiesen sich als avirulent, d. h. Maus-apathogen, unabhängig davon, welchem Typ sie angehörten oder welch eine Fermentaktivität sie besassen.

Mit zwei Stämmen, die hyaluronidase- und streptokinasenegativ waren, wurden 32 Mäusepassagen durchgeführt. Die Stämme wurden in dieser Weise virulent, aber sie erwarben doch keine Fermentaktivität. Zwischen Virulenz und Fermentaktivität konnte also kein Zusammenhang festgestellt werden.

LITERATUR

1. *Fuller, A. T.:* Brit. J. exper. Path. **19,** 130 (1938).
2. *Griffith, F.:* J. Hyg. **25,** 385 (1926); **26,** 363 (1927); **27,** 113 (1928).
3. *McClean, D.:* J. Path. Bakt. **53,** 13 (1941).
4. *Joffe, V. J.:* Skarlatina. Moskau, 1948.
5. *Ciuca* und *Baldovin:* Vortrag am mikrobiologischen Kongress, Prag, 1950.
6. *Strauss, J.:* Časop. Lék. Česk. **89,** 1379 (1950).
7. *Raška, K., Aldova, E., Cermakova, J., Rotta, J.:* Časop. Lék. Česk. **88,** 1244 (1949).
8. *Wigodtschikow, G. V.:* Vortrag am Streptokokken Kongress, Prag, 1954.
9. *Pakula, R.:* Vortrag am Streptokokken Kongress, Prag, 1954.
10. *Swift, H. F., Wilson, A. T.* und *Lancefield, R. C.:* J. exp. Med. **78,** 127 (1943).
11. *Sherwood, N. P.* und *Russel, B.:* J. inf. Dis. **84,** 64 (1949).
12. *Boas, N. F.:* J. Biol. Chem. **181,** 573 (1949).
13. *Humphrey, J. H.:* J. Path. & Bact. **56,** 273 (1944).
14. *Hadfield, J., Magee, V.* und *Perry, C. B.:* Lancet **1,** 834 (1934).
15. *Kass, E. H., Seaston, C. V.:* J. exp. Med. **79,** 319 (1944).
16. *Hirst, G. K.:* J. exp. Med. **73,** 493 (1941).
17. *Rothbard, S.* und *Todd, E. W.:* J. exp. Med. **87,** 283 (1948).
18. *Elliott, S. D.:* J. exp. Med. **81,** 573 (1945).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИПОВ, ВИРУЛЕНТНОСТИ И ЭНЗИМАТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ШТАММОВ СКАРЛАТИНОЗНЫХ СТРЕПТОКОККОВ В ВЕНГРИИ

И. Фюрес, И. Михайфи, Б. Ланьи и *К. Гал*

Резюме

В 1949—51 и 1953 годах авторы производили определение групп и типов 672 штаммов streptococcus haemolyticus. Штаммы были изолированы из гортани больных скарлатиной, непосредственно после госпитализации.

В группу «А» входили 659 штаммов, в группу «С»—12, а в группу «G»—1 штамм. В пределах группы «А» наиболее частыми были следующие типы: 4(24/29): 45—31%, 1: 31—27%, 6: 3—16%.

Авторы определяли чувствительность к пенициллину 150 штаммов выделенных в 1953 году: не обнаружили ни одного резистентного штамма.

В дальнейшем исследовали стрептокиназную и гиалуронидазную активность вышеупомянутых 150 штаммов. Из этих штаммов 89% образовывали стрептокиназу, а 38% — гиалуронидазу. Ни один из штаммов типа 1 не выявлял гиалуронидазной активности.

Исследовали также вирулентность 10 штаммов, относящихся к различным типам и выявляющих различную ферментативную активность. Все штаммы оказались авирулентными, или — вернее сказать — апатогенными для мышей, независимо от их типа и ферментативной активности.

Затем было проведено 32 пассажа на мышах двух не образующих стрептокиназу и гиалуронидазу штаммов. Вследствие этого штаммы стали вирулентными, но не приобрели ферментативной активности.

Таким образом авторы не могли определить существования связи между вирулентностью и ферментативной активностью штаммов.

SITZUNG DER ENTERALEN THEMENKOMMISSION DER UNGARISCHEN AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN, AM 14. DEZEMBER 1954

(ZUSAMMENFASSUNG)

K. RAUSS,

Vorsitzender der Kommission

Die Enterale Themenkommission befasst sich im Rahmen einer planmässigen und koordinierten Forschungstätigkeit mit den ungelösten Problemen der enteralen Erkrankungen des Säuglingsalters. Die Ergebnisse ihrer Arbeit gelangen auf einer jährlich abgehaltenen wissenschaftlichen Sitzung zur Erörterung und Diskussion. Nachstehende Zusammenfassung bespricht die Resultate der 1954 geleisteten Forschungsarbeit, und zwar auf Grund der Vorträge gelegentlich der Sitzung im Dezember 1954.

1. Epidemiologische Angaben

Ein Bericht [1] gab eine Epidemie in einem Säuglingsheim bekannt die durch *Escherichia coli* O 26 B6 verursacht worden war. Im Verlauf der Epidemie erkrankten 14 von den 31 in den Säuglingsheim Gepflegten, und zwar Säuglinge und Kleinkinder über einem Jahr in etwa gleichem Verhältnis. Das Referat verdient von mehreren Gesichtspunkten aus Beachtung. Erstens, dass Epidemiegefahr dauernd besteht; zweitens ist es beachtenswert, dass Stamm O 26 Epidemien verursachen kann. Meines Wissens ist dies die erste Beobachtung, die Serotyp O 26 als Ursache einer Epidemie nachgewiesen hat. Ein weiterer interessanter Umstand — den bisherigen Beobachtungen gegenüber — ist, dass die Epidemie Säuglinge in gleichem Ausmass betraf, wie Kinder über dem ersten Lebensjahr.

Die übrigen Vortragenden berichteten im allgemeinen über sporadische Fälle. Nach der einen Beobachtung [4] wurden bei 8% von 254 an Diarrhöe leidenden Säuglingen und Kindern Coli dyspepsiae (C. d.) gefunden und bei 70% war kein bekannter Krankheitserreger nachzuweisen. Eine andere Beobachtung [6] fand 18% C. d. bei Säuglingen — und 7% bei Kindern, über ein Jahr. Das Zuchtverhältnis ist etwas niedriger, als im vorangegangenen Jahr, und die sich auf Dysenterieinfektionen beziehenden Angaben sind höher.

Auf eine bisher nicht bekannte Ursache der Rezidiven weist jene Beobachtung [9] hin, wonach bei den Krankheitserreger in Rachen bergenden Säug-

lingen sich die schon geheilt geglaubte Enteritis fast regelmässig von neuem meldete.

2. Neue pathogene Colistämme

Die aus dem Stuhl der Kranken isolierten und auf Grund ihrer Empfindlichkeit Phagen gegenüber selektierten Colistämme unbekannter antigener Struktur werden von einem der Vortragenden [17] für bisher nicht erkannten pathogenen Stämme gehalten.

Die Realität dieser Feststellungen wird dadurch entschieden werden, in welcher Verbindung die neuerdings beschriebenen Serotypen des C. d. mit den mit Hilfe der Phagenuntersuchung isolierten Stämmen stehen und in welcher Häufigkeit sie in Säuglingsenteritis gezüchtet werden können.

3. Die krankheitserregende Rolle sonstiger Stämme

Auch zur Klärung der pathokausalen Rolle der Proteus- und Pyocyaneusstämme wurden mehrere Untersuchungen durchgeführt ; die Meinungen weichen voneinander ab. Einzelne Beobachter [4, 5] fanden solche im Stuhl gesunder und kranker Personen im gleichen Verhältnis und schreiben dem Befund keine ätiologische Bedeutung zu. Anderen Beobachtern [14] zufolge ist — in Verbindung mit einer unter Säuglingen verläufenen kleineren Epidemie — auf Grund der Bestimmung von Antigenstruktur und Phagentyp die Annahme, dass die Krankheit durch Pyocyaneus verursacht wurde, äusserst begründet.

Es tauchte auch das Problem der Staphylokokkenenteritis auf und ernste Argumente sprachen dafür, dass dieser Krankheitserreger in einzelnen Fällen Enteritis verursachen kann [5].

Das systematische Studium der sog. saprophytischen Darmbakterien bietet sich als besondere Aufgabe dar. Zur Vermehrung des Staphylokokkus kann jedoch auch die Antibiotika-Behandlung eine Möglichkeit ergeben — das ist ein Gesichtspunkt, den man in Verbindung mit der Antibiotica-Therapie nicht vergessen darf. Der auf Antibiotica-Behandlung eintretenden Veränderung der Darmflora folgt im allgemeinen eine Verringerung der Coliflora und eine Vermehrung der Enterokokken, anaeroben Bakterien und Pilze [12]. Es wäre erwünscht, die eventuellen pathologischen Folgen der im Gleichgewicht der Darmflora eintretenden Änderung weiter zu studieren.

4. Serologische Diagnostik

Ein geeignetes serologisches Verfahren würde die entscheidende Bestätigung der noch häufig umstrittenen Ätiologie mit sich bringen. Dahingerichtete Versuche führten zu keinem befriedigenden Ergebnis — nicht einmal solche

mit der empfindlichen Hämagglutinationsmethode [19]. Wir hörten einen Bericht über die Hämagglutinationsergebnisse von 150 Erwachsenen, 60 gesunden und 24 kranken Säuglingen. Auch die 24, bakteriologisch positiven Säuglinge zeigten das gleiche Resultat wie die Gesunden. Die Entwicklung der Agglutinine kann selbstverständlich — neben dem als ungenügend angenommenen Immunapparat der Säuglinge — auch durch die frühe Antibiotika-Dosierung gehemmt werden. Die Untersuchungen haben demnach diese Frage nicht vorwärts gebracht und es bleibt somit dabei, dass es bei einer C. d.-Infektion nur in einzelnen Fällen gelingt, eine überzeugende serologische Reaktion zu beobachten.

Diese Erfolglosigkeit der serologischen Diagnostik erklären neuartige Untersuchungen mit der, die Antigenstruktur modifizierenden Wirkung des Bakteriophagen [18]. Während die aus dem Stuhl der Kranken isolierten und verschiedenen Phagtypen entsprechenden Colistämme von unbekannter Antigenstruktur im Blutserum der Kranken agglutiniert würden, agglutinierten — die «klassische» C. d.-Stämme ausscheidenden Kranken — mangels eines spezifischen Phagen die homologen Stämme nicht. Auch mit entsprechenden, aus dem Stuhl von Kranken isolierten und mit Phag behandelten Colistämmen kam eine Agglutination zustande. All dies weist — der Vortragenden nach — darauf hin, dass der Phag imstande ist, die serologische Spezifizität der Colistämme tiefgehend zu verändern. Diese Auffassung knüpft sich eng an jene frühere Feststellung der Vortragenden, wonach ohne Phagenassoziation keine Krankheit zustande kommen kann. Die gegenwärtige weitere Entwicklung dieser Theorie besteht darin, dass der Phag bei der Gestaltung des serologischen Typs mitwirkt. Der Vortragenden zufolge gestatten diese Feststellungen einen Einblick in den Mechanismus der Bildung pathogener Colistämme und weisen darauf hin, dass der im Darmkanal befindliche Phag vom Gesichtspunkt des Zustandekommens der Krankheit einen ebenso wesentlichen Faktor darstellt, wie das krankheitserregende Bakterium. Die Theorie unterstellt sogar zwei Möglichkeiten der Infektion : die durch Krankheitserreger und die durch Phagen erfolgende Infektion. Die Aufstellung der allgemeinen Gültigkeit dieser Theorie würde zu äusserst weitgehenden Folgerungen führen ; eng auf den Gegenstand bezogen, scheint sie die ätiologische Rolle gewisser Colistämme von unbekannter Antigenstruktur zu bestätigen, da diesen gegenüber Agglutinine nachzuweisen sind.

5. Resistenz der C. d.-Stämme. Desinfizientenwirkung

Die Desinfizierung der Hände ist wegen des relativen Widerstandes des Krankheitserregers mit den üblichen Desinfizienten, Konzentrationen und unter der üblichen Einwirkungszeit erfolglos [6].

Im Anschluss an eine eingehende Untersuchung stellte es sich heraus dass an der, durch C. d. enthaltenden Stuhl verunreinigten Windel der Mikro-

organismus mehr als 100 Tage am Leben blieb. Den sich auf die praktische Ausführung der Desinfizierung beziehenden Untersuchungen zufolge bietet sich zur Desinfizierung von Windeln eine Ryfenlösung von 1/5000 als geeignet dar, und zwar nach ein- bis zweistündigem Einweichen. Zur Desinfizierung von Möbeln eignet sich jedoch eine 1/50 Verdünnung von Sterogenol am besten, während Zwecks Desinfizierung der Hände gleichfalls Sterogenol sich — in einer Lösung von 0,1% als befriedigend erwies, falls das Händewaschen mindestens 2—3 Minuten dauert. Die Berücksichtigung dieser Angaben ist ausserordentlich erwünscht, da die Übertragung des Krankheitserregers am wahrscheinlichsten mittels der Hände und verunreinigter Gegenstände erfolgt [15].

6. Antibiotika-Resistenz

Vom Gesichtspunkt der Therapie ist die Resistenz der Stämme äusserst wesentlich. Mit dem Auftauchen resistenter C. d.-Stämme muss gerechnet werden. Einer der Beobachter [4] fand Chloromycetin- und Streptomycin- resistente Stämme, welche erst auf Aureomycin reagierten. Die resistenten Stämme verursachen verständlicherweise schwer beeinflussbare Fälle.

Der Umstand, dass in einzelnen Fällen die Rolle des Proteus und des Pyocyaneus nicht auszuschliessen ist, begründete die Durchführung jener Untersuchungen, die auf Bestimmung der Empfindlichkeit dieser organismen gerichtet waren [13]. Diese schwer beeinflussbaren Bakterien wiesen selbst den angewandten Antibiotika-Kombinationen gegenüber kaum eine Empfindlichkeit auf, was in ernsthafter Weise die Gabe solcher Antibiotica begründet, die spezifisch gegen diese Mikroben bekannt sind (Neomycin, Polymyxin).

7. Dystrophisierende Wirkung

Die Erkenntnis der dystrophisierenden Wirkung des C. d. hat Licht auf eine wesentliche schädigende Fähigkeit des Krankheitserregers geworfen. Wiederum würden Angaben über die, an Frühgeborenen ausgeübte dystrophisierende Wirkung des C. d. bekanntgegeben: Die mit C. d. infizierten Frühgeborenen bleiben in ihrem Gewicht signifikant hinter den nicht infizierten zurück [7]. Eine weitere Beobachtung weist darauf hin, dass Alter und Ernährungszustand, sowie ein gleichzeitig bestehender parenteraler Herd für das Tempo der Reparation der Krankheit ausserordentlich wichtig sind [8].

8. Pathogenese

Zur Lösung mehrerer Fragen der Pathogenese wurden Untersuchungen vorgenommen.

Wir sahen wiederum Angaben bezüglich der eigenartigen Altersverteilung dieser Kranken und fanden von neuem bestätigt, dass künstlich ernährte Säuglingen öfter an C. d. erkranken, doch zugleich stellte sich heraus, dass die Schwere der Krankheit von der Beschaffenheit der Ernährung vor derselben (ob natürlich oder künstlich) nicht beeinflusst wird [6].

Zur Erklärung der eigenartigen Altersverteilung formte sich unter anderem die Annahme, dass das Verschwinden der B. bifidum flora, sowie der Mangel an Immunität im Säuglingsalter als wesentliche Faktoren in Frage kommen dürfen.

Der Antagonismus zwischen B. bifidum und C. d. erfuhr *in vitro* zweifellose Bestätigung und es ist sehr wahrscheinlich, dass die Ursache dafür in einer Substanz von antibiotischem Charakter zu suchen ist, wenn es auch nicht gelangt, diese Substanz selbst nachzuweisen [11]. Diese Untersuchungen müssten mit Vergleich der Darmflora kranker und gesunder Säuglinge ergänzt werden.

Es gelangt nicht, die sich auf die, in der Immunität von Säuglingen und Erwachsenen meldende Differenz konstruierte Auffassung zu unterstützen. In einem passiven Mäuseschutzexperiment gelang es nicht, bei laut dieser Theorie als immun supponierten Erwachsenen Coli-Immunität zu demonstrieren. Ebensowenig gelang es, die über die Schutzwirkung des Colostrums gebildete Meinung zu bestätigen [20].

Einige Angaben des Schrifttums weisen darauf hin, dass C. d.-Infektionen — wenn auch seltener — auch über das Säuglingsalter hinaus vorkommen. In sporadischen Fällen sind diesbezügliche heimische Beobachtungen schon seit früher bekannt, jetzt wurde jedoch über eine solche Epidemie berichtet, in der Kinder über einem Jahr im gleichen Verhältnis erkrankten, wie Säuglinge [1]. Diese Beobachtung zeigt, dass es auch ausserhalb der am stärksten disponierten Altersklassen eine epidemieartige Erkrankungskette geben kann, wenn sich die Umstände hiezu geeignet gestalten.

All dies weist auf die komplizierte Wechselwirkung von Krankheitserreger und Organismus hin und verwahrscheinlicht, dass die Bedingungen der C. d. Enteritis auch über das Säuglingsalter hinaus vorhanden sein können — andererseits bestehen diese Requisiten selbst im Säuglingsalter nicht notgedrungen zu jeder Zeit.

Hierauf weist auch jene Beobachtung hin, wonach unter 400 Neugeborenen im Alter von 4—8 Tagen drei gesunde C. d.-Ausscheider gefunden wurden. Es gelang, die Infektionsquelle in den sonst gesunden Müttern zu entdecken [2].

Auch die an Säuglingskollektiven durchgeführten systematischen Untersuchungen weisen auf die entscheidende Rolle des Organismus hin. Es wurde beobachtet [3], dass während eines Jahres mindestens 50% der in Säuglings heimen gepflegten mit C. d. infiziert wird, doch erkranken höchstens 10% der Infizierten. Diese relative Resistenz der in Krankenhausepidemien gefundenen hohen Kontagiosität gegenüber wirft ein interessantes Problem auf.

Als Bedingung des Zustandekommens der Krankheit wurde die Möglichkeit der Infizierung des Dünndarms angenommen [16] und hier wird der Infektionsherd gesucht. Den zur Bestätigung dieser Auffassung vorgenommenen Untersuchungen zufolge ist der Krankheitserreger tatsächlich im Dünndarm zu finden und deshalb kann die vorerwähnte Hypothese in der Tat nicht verworfen werden — doch zum Beweis ihrer Ausschliesslichkeit bedarf es noch weiterer Untersuchungen.

Interessant sind auch jene Untersuchungen [16], wonach das Coli-Endotoxin im Kreislauf und im Stoffwechsel des Versuchstieres zu solchen Veränderungen führt, welche eine Parallele zu einzelnen Krankheitssymptomen der Toxikose des Säuglingsalters bilden. Im weiteren ist noch zu klären, ob nicht das Endotoxin anderer gramnegativer Bakterien zu ähnlichen Symptomen führt, d. h. ob es sich um eine spezifisch, oder um eine für jedes gramnegative Endotoxin charakteristische Wirkung handelt. Die erstere Bedingung würde die noch häufig geleugnete Colitheorie sehr unterstützen.

Das Programm der Sitzung

1. *Bugyi, Gy.:* Eine durch den Typ O 26 B_6 verursachte Epidemie.
2. *Fazekas, L.,* und *Bognár, Sz.:* Untersuchungen bezüglich der C. d.-Ausscheidung von Neugeborenen.
3. *Rudnai, O.* und *Mihályfi, I.:* Untersuchungen bezüglich C. d. in Säuglingsheimen.
4. *Kulin, L.:* Beobachtungen bei Säugling Dyspepsie.
5. *Fürész, I., Révész, K., Székely, Á.* und *Vincze, I.:* Diesjährige klinische und bakteriologische Erfahrungen in Verbindung mit enteralen Infektionen des Säuglingsalters.
6. *Timár, A.* und *Vetro, J.:* Einfluss des Stillens und der künstlichen Ernährung auf durch C. d. verursachte Infektionen.
7. *Timár, A.* und *Vetro, J.:* Die dystrophisierende Wirkung des C. d.
8. *Farkas, G.:* Die infektiöse Wirkung des C. d. auf Säuglinge von verschiedenem Alter und verschiedener Ernährungszustand.
9. *Farkas, G.* und *Szécsey, Gy.:* Die Bedeutung der bakteriologischen Untersuchung des Rachens bei C. d.-Erkrankungen.
10. *Jeney, E.* und *Melles, Z.:* Untersuchung des Salmonella — *E. coli* Antagonismus.
11. *Jeney, E.* und *Csokonai, L.:* Untersuchung des *B. bifidum* — *E. coli* Antagonismus.
12. *Váczi, L., Szántó, R.* und *Csillag, A.:* Veränderung der Darmflora auf Wirkung von Chloramphenicol-Behandlung.
13. *Bodó, T.* und *Gyengési, L.:* Resistenzuntersuchungen mit Antibiotika-Kombinationen.
14. *Gyengési, L., Bodó, T., Kelemen, I.* und *Tóth, L.:* Häufung von durch Pyocyaneus verursachten Durchfallserkrankungen in einer Frühgeborenen Abteilung.
15. *Szita, J.:* Wirkung von Desinfektionsmitteln auf enterale Krankheitserreger.
16. *Ferencz, P., Boda, D., Kiss, S., Végh, Gy.* und *Mihály, I.:* Analyse der Endotoxinwirkung des *E. coli.*
17. *Eörsi, M., Jablonszky, L.* und *B. Milch, H.:* Forschung nach neuen pathogenen Colistämmen.
18. *Eörsi, M., Jablonszky, L.* und *B. Milch, H.:* Serologische Untersuchungen.
19. *Fazekas, L.* und *Bognár, Sz.:* Serologische Untersuchungen.
20. *Tóth, L.:* Untersuchungen bezüglich der C. d.-Immunität von Erwachsenen.

A kiadásért felel: az Akadémiai Kiadó igazgatója Műszaki felelős: Farkas Sándor
A kézirat beérkezett: 1955. III. 30. — Terjedelem: $10^3/_4$ (A/5) ív, 23 ábra

Akadémiai Nyomda, Gerlóczi u. 2. — 36097/55 — Felelős vezető: ifj. Puskás Ferenc

Les Acta Microbiologica paraissent en russe, français, anglais et allemand et publient des travaux du domaine de la microbiologie.

Les Acta Microbiologica sont publiés sous forme de fascicules qui seront réunis en un volume.

On est prié d'envoyer les manuscrits destinés à la rédaction, et écrits à la machine, à l'adresse suivante :

Acta Microbiologica, Budapest, Keleti Postahivatal, Postafiók 64.

Toute correspondance avec la rédaction doit être envoyée à cette même adresse.

Le prix de l'abonnement est de 110 forints par volume.

On peut s'abonner à l'Entreprise pour le Commerce Extérieur de Livres et Journaux «Kultúra» (Budapest, VI., Sztálin út 21. Compte-courant No. 43-790-057-181) ou à l'étranger chez tous les représentants ou dépositaires.

Le numéro suivant paraîtra en décembre 1955.

The Acta Microbiologica publish papers on microbiological subjects in Russian, French, English and German.

The Acta Microbiclogica appear in parts of varying size, making up one volume.

Manuscripts should be typed and addressed to

Acta Microbiologica, Budapest, Keleti Postahivatal, Postafiók 64.

Correspondence with the editors should be sent to the same address.

The rate of subscription to the Acta Microbiologica is 110 forints a volume. Orders may be placed with «Kultúra» Foreign Trade Company for Books and Newspapers (Budapest, VI., Sztálin út 21. Account No. 43-790-057-181) or with representatives abroad.

The next number will be issued in December 1955.

Die Acta Microbiologica veröffentlichen Abhandlungen aus dem Berciche der Mikrobiologie in russischer, französischer, englischer und deutscher Sprache.

Die Acta Microbiologica erscheinen in Heften wechselnden Umfanges. Mehrere Hefte bilden einen Band.

Die zur Veröffentlichung bestimmten Manuskripte sind, mit Maschine geschrieben, an folgende Adresse zu senden :

Acta Microbiologica, Budapest, Keleti Postahivatal, Postafiók 64.

An die gleiche Anschrift ist auch jede für die Redaktion bestimmte Korrespondenz zu richten.

Abonnementspreis pro Band 110 Forint. Bestellbar bei dem Buch- und Zeitungs-Aussenhandels-Unternehmen «Kultúra» (Budapest, VI., Sztálin út 21. Bankkonto Nr. 43-790-057--181) oder bei seinen Auslandsvertretungen und Kommissionären.

Die nächste Nummer erscheint in Dezember d. J.

INDEX

Tarnóczy, T., Jó, I. und *Szilárd, J.:* Detoxikationswirkung von Ultraschallwellen auf das Endotoxin der *Salmonella typhi* — *Тарноци, Т., Йоо, И.* и *Силард, Я.:* Обезвреживающее действие ультразвуков на антиген тифозной палочки ... 327

Kesztyűs, L., Salánki, J. und *Koller, M.:* Nervensystem und Immunität III. Die Wirkung von Neurotomie auf das Arthus—Sacharow-Phänomen — *Кестьюш, Л., Шаланки, Я.* и *Коллер, М.:* Нервная система и иммунитет III. Влияние невротомии на феномен Артюса—Сахарова 337

Kesztyűs, L., Csernyánszky, H., Koller, M. und *Salánki, J.:* Nervensystem und Immunität IV. Die Wirkung von Neurotomie und Narkose auf das Shwartzman-Phänomen — *Кестьюш, Л., Черньянски, Г., Коллер, М.* и *Шаланки, Я.:* Нервная система и иммунитет IV. Влияние невротомии и наркоза на феномен Шварцмана 343

Kesztyűs, L., Szilágyi, T. und *Csernyánszky, H.:* Nervensystem und Immunität V. Die Wirkung von Neurotomie auf die Diphtherietoxinempfindlichkeit der Haut — *Кестьюш, Л., Силадьи, Т.* и *Черньянски, Г.:* Нервная система и иммунитет V. Влияние невротомии на чувствительность кожи к дифтерийному токсину 353

Váczi, L., Gál, K. und *Kubinyi, M.:* Über die Eigenschaften der Chloramphenicol-resistenten E. coli 0 : 111, B : 4-Stämme — *Вацци, Л., Гал, К.* и *Кубиньи, М.:* Изменение свойств штаммов E. coli 0 : 111, B : 4 под воздействием хлорамфеникола 359

Wix, G.: Versuche zur Isolierung von Lithocholsäure-abbauendem Mikroorganismus — *Викс, Дь.:* Эксперименты по выделению микроорганизмов, разлагающих литоколовую кислоту 369

Sinkovics, J.: Virus Neutralisation Experiments with Lymphoid Cell- and Lymph Node-Extracts — *Шинкович, Й.:* Эксперименты по нейтрализации вирусов экстрактами лимфатических клеток и узлов 385

Rauss, K. and *Kétyi, I.:* Immunity in Subjects Recorvered from Dysentery — *Рауши, К.* и *Кетьи, И.:* Изучение иммунитета людей переболевших дизентерией 401

Koczka, I.: Experimentelle Studien über die gemeinsame Anwendung von antituberkulotischen Mitteln II. Tierexperimente — *Коцка, И.:* Экспериментальные исследования по совместному применению противотуберкулезных препаратов 409

Oláh, P.: Experimental Production of Tetanus Antiserum in Sheep — *Олах, П.:* Опыты по производству противостолбнячных сывороток овец 415

Gregács, M.: Serological and Biochemical Typing of *E. coli* Strains Occurring in Various Waters — *Грегач, М.:* Определение серологических и биохимических типов штаммов E. coli, обнаруживаемых в различных водах 423

Balázs, V. and *Pintér, M.:* Studies on Coxsackie Virus Infection in Hungary II. Studies on Neutralising Antibodies against Fourteen Different Types of Coxsackie Virus in Individual and Pooled Human Sera — *Балаж, В.* и *Пинтер, М.:* Изучение заражений вирусом Coxsackie в Венгрии. II. Изучение нейтрализующих антител к 14 различным типам вируса Coxsackie в индивидуальных и смешанных человеческих сыворотках 429

Fűrész, I., Mihályfi, I., Lányi, B. und *Gál, K.:* Typenbestimmung, Virulenz und Fermentaktivität der Scharlach-streptokokkenstämme in Ungarn — *Фюрес, И., Михайфи, И., Ланьи, Б.* и *Гал, К.:* Определение типов, вирулентности и энзиматической активности штаммов скарлатинозных стрептококков в Венгрии 435

Rauss, K.: Sitzung der enteralen Themenkommission der Ungarischen Akademie der Wissenschaften, am 14. Dezember 1954 445